

Zur Behandlung der Arsenvergiftung mit geschützten Dithiolen

Harald Mückter

Dissbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

Zur Behandlung der Arsenvergiftung mit geschützten Dithiolen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Harald Mückter

aus

Stolberg/Rhld.

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. W. Forth
2. Priv.-Doz. Dr. G. Drasch
Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. Dr. W. Neupert
2. Prof. Dr. W. Eisenmenger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1988

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Dezember 1985 bis Januar 1987 am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Forth danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit und die immer gewährte, großzügige Unterstützung.

Herzlich danken möchte ich Herrn PD Dr. L. Szinicz für die Einführung in das interessante Arbeitsgebiet und für seine wertvollen Ratschläge und Diskussionsbeiträge im Fortgang der Untersuchungen.

Herrn PD Dr. B. Fichtl danke ich für seine stets hilfreiche Betreuung.

Herr Dr. D. Wildenauer stellte mir für die chemischen Synthesen dankenswerter Weise sein Glasgerät zur Verfügung und ermöglichte die Aufnahme des 200 MHz-NMR-Spektrums.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. R. Pasch für die kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung und für wesentliche Ratschläge bei der Abfassung des Manuskriptes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn S. Islambouli, ohne dessen ständige Hilfsbereitschaft bei allen Schwierigkeiten und ohne dessen exzellente und geduldige Anleitung bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen der Fortgang der Arbeiten sehr erschwert worden wäre.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Walther-Straub-Institutes für ihre große Geduld, die ich bei den Synthesen der Schwefelverbindungen manchmal bis zum äußersten strapaziert habe.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	VII
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	X
A Zusammenfassung.....	1
B Allgemeiner Teil	3
1. Toxikologische Bedeutung des Arsens.....	3
1.1 Eigenschaften, Vorkommen, Verwendung und Nachweis	5
1.2 Giftigkeit verschiedener Arsenverbindungen	8
1.3 "Normalwerte" von Arsen beim Menschen	16
2. Vergiftung mit As_2O_3 als Modellfall.....	19
2.1 Klinik der Arsenvergiftung.....	20
2.2 Verteilung und Metabolisierung von Arsen.....	25
2.3 Biochemie der Arsenvergiftung.....	27
3. Therapie der Arsenvergiftung	36
3.1 Antidote: Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	39
3.2 vic-Dithiole mit Amidfunktion	45
4. Problemstellung.....	49
C Ergebnisse.....	52
5. Chemische Synthesen und Analytik	52
5.1 2,3-Dimercaptopropionamid (DMPA).....	56
5.1.1 Darstellung von 2,3-Dibromopropionamid.....	56

5.1.2	Untersuchungen zur Darstellung von DMPA	57
5.2	2,3-Dimercaptopropansulfonamid (DMPSA)	60
5.2.1	Darstellung von Allylsulfonat-Natrium	62
5.2.2	Darstellung von Allylsulfochlorid.....	64
5.2.3	Darstellung von Allylsulfonamid	65
5.2.4	Darstellung von 2,3-Dibromopropansulfonamid.....	67
5.2.5	Darstellung von 2,3-Bis(acetylthio)propansulfonamid (BAPSA)	69
5.2.6	Darstellung von 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonamid (DTMSA)	72
5.2.7	Untersuchungen zur Darstellung von von 2,3-Dimercaptopro- pansulfonamid (DMPSA).....	73
5.3	Oxidationsprodukte des 2,3-Dimercaptopropansulfonats (oxDMPS _x)	77
5.3.1	Darstellung des Pb-DMPS-Addukts.....	80
5.3.2	Darstellung von oxidiertem DMPS (oxDMPS _x).....	81
5.3.3	Darstellung von 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonat- Natrium (DTMS).....	88
5.4	in-vitro Untersuchungen zum Vergleich von DMPS und DMSA	91
5.4.1	Qualitative Abschätzung der relativen Stabilitäten verschiedener Metall- komplexe von DMPS und DMSA in wässriger Lösung.....	91
5.4.2	Oxidationsempfindlichkeit von DMPS, DMSA und BAPSA	96
6.	Untersuchung der Wirksamkeit einiger Verbindungen bei der Vergiftung mit As ₂ O ₃	102

6.1	in-vitro Prüfung der Wirksamkeit an Nierentubulizellen der Ratte.....	102
6.2	in-vivo Prüfung der Wirksamkeit an NMRI-Mäusen.....	115
7	akute Toxizität von BAPSA	119
D	Diskussion	122
E	Materialien und Methoden	128
F	Literaturverzeichnis.....	136

Verzeichnis der Abkürzungen

abs.	absolut
BAL	British Anti Lewisite; 2,3-Dimercaptopropanol
BAPSA	2,3-Bis(acetylthio)propan-1-sulfonamid
beg.	beginnend
Ber.:	berechnet
CMC	Carboxymethylcellulose
DC	Dünnschichtchromatografie
diars	o-Phenylenbis(dimethylarsin)
DMA	Dimethylarsinsäure
DMPA	α,β -Dimercaptopropionamid
DMPPA	N-(2,3-dimercaptopropyl)phthalamidsäure
DMPS	2,3-Dimercaptopropan-1-sulfonat-Natriumsalz
DMPSA	2,3-Dimercaptopropan-1-sulfonamid
DMSA	2,3-Dimercaptobernsteinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.Th.	der Theorie
DTMS	1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonat-Natriumsalz
DTMSA	1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonamid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
ED	Effektivdosis
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat-Natriumsalz
EGF	epidermal growth factor
EtOH	Ethanol

VIII

fbI.	farblos
FG	Formelgewicht
Gef.:	gefunden
Gew.	Gewicht(s)-
HPLC	high-performance liquid chromatography
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
I.	löslich
LD	Letaldosis
Lit.	Literatur
II.	leicht löslich
Lsg.	Lösung
MBG	Metall-bindende Gruppe
MDK	Magen-Darm-Kanal
MESNa	2-Mercaptoethansulfonat-Natriumsalz
MMA	Monomethylarsonsäure
NAPDA	N,N'-(2-aminoethyl)-propan-1,3-diamin
Ndg.	Niederschlag



oxDMPS_x Oxidationsprodukte von DMPS ("Bisdisulfide")

PAO Phenylarsenoxid

PBS phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

p.o. peroral

PP Polypropylen

rac racemisch

RT Raumtemperatur

s.c. subcutan

Smp. Schmelzpunkt

Tg. Tag(e)

THF Tetrahydrofuran

TMS Tetramethylsilan

TRK Technische Richtkonzentration

unl. unlöslich

versch. verschieden(e)

vic vicinal, benachbart

W. Wirkung

wl. wenig löslich

ZNS Zentralnervensystem

Zers. Zersetzung

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

- Abb. 1: Darstellung und Zerfall wichtiger Arsenisotope
- Tab. 1: Typische Eigenschaften verschiedener Klassen von Arsenverbindungen
- Abb. 2: Inaktivierung von Enzymen nach Blockierung des Lipoamid-Cofaktors
- Abb. 3: Vierstufiges Reaktionsmodell der Reduktion von Diaphorase in Gegenwart von Arsenit
- Abb. 4: Reduktion von Arsenit durch BAL
- Tab. 2: ED 50 und LD 50 von verschiedenen Dithiolen
- Abb. 5: Typische Strukturmerkmale eines Antidots gegen Arsen
- Abb. 6: Hypothetische, relative Ringstabilitäten von Thioarseniten
- Tab. 3: Ausgewählte Unterschiede im Wirkungsspektrum strukturverwandter Verbindungen
- Abb. 7: Vorstufen zur Darstellung von 2,3-Dimercaptopropan-1-sulfonamid
- Abb. 8: 60 MHz ^1H - NMR - Spektrum von Allylsulfonat
- Abb. 9: 60 MHz ^1H - NMR - Spektrum von Allylsulfonamid
- Abb.10: 60 MHz ^1H - NMR - Spektrum von 2,3 - Dibromopropan-sulfonamid
- Abb.11: 60 MHz ^1H - NMR - Spektrum von 2,3 - Bis(acetylthio)-propan-sulfonamid
- Abb.12: Stereoisomerengemisch bei dimerer Bis(disulfid)-Bildung aus rac-DMPS

- Abb.13: Disulfidbildung durch Oxidation mit Schwefel nach Field /Cragg
- Abb.14A: Gelchromatogramm von DTMS und Oxidationsprodukten des DMPS
- Abb.14B: HPLC-Chromatogramm von frisch aufgelöstem DMPS
- Abb.14C: HPLC-Chromatogramm der niedermolekularen Fraktion
- Abb.14D: Rechromatografie der in Abb. 14C geschnittenen Fraktion
- Abb.14E: HPLC-Chromatogramm der mit $\text{Zn}/\text{H}_3\text{O}^+$ reduzierten Fraktion
- Abb.15: 200 MHz ^1H - NMR - Spektrum von DTMS
- Tab. 4: Eigenschaften der Addukte verschiedener Metalle mit BAL, DMPS und DMSA
- Abb.16: Kinetische Stabilität verschiedener Metallkomplexe von DMPS und DMSA
- Abb.17A: Jodometrische Bestimmung der zeitlichen Abnahme der SH-Aktivität von DMPS
- Abb.17B: Photometrische Bestimmung der zeitlichen Abnahme der SH-Aktivität von DMPS
- Abb.18: Zeitliche Abnahme der SH-Aktivitäten von DMPS und DMSA in PBS
- Abb.19: Ventraler Situs der Ratte nach Freilegung der Leberpforte
- Abb.20: Situs nach Ligatur und Kanülierung der Pfortader
- Abb.21: Isolierte Rattennieren
- Abb.22: Rattennierentubuli in KH-Puffer m. Trypan-Blau
- Abb.23A: Einfluß verschiedener Testsubstanzen auf die Hemmung
+23B: der Gluconeogenese in Rattennierentubuli durch As_2O_3
- Tab. 5: Antidotwirkung verschiedener Testsubstanzen auf die durch Arsen gehemmte Gluconeogenese in Rattennierentubuli

- Abb.24: Einfluß von DTMS, DTMSA und ox(DMPS)_x auf die normale Gluconeogenese aus Pyruvat in isolierten Rattennierentubuli
- Abb.25: Absterbekurve für verschiedene Antidote gegen Arsenik
- Tab. 6: orientierende Bestimmung der akuten Toxizität für BAPSA bei NMRI-Mäusen

A Zusammenfassung

Mit der Darstellung von 2,3-Bis(acetylthio)propan-1-sulfonamid (BAPSA) wurde eine Substanz zugänglich, die bei günstiger akuter Toxizität ($LD_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$, Maus i.p.) sowohl in vitro (Aufhebung der Stoffwechselblockade durch As_2O_3 am Beispiel der Gluconeogenese in isolierten Rattennierentubuli) als auch in vivo (Verringerung der akuten Toxizität von As_2O_3 bei der Maus) gut wirksam gegen die Vergiftung mit Arsenik ist.

In dieser Hinsicht ist BAPSA den bekannten Arsenantidotem vom Dithiol-Typ gleichwertig, obwohl es in der Darreichungsform keine freien Sulfhydrylgruppen besitzt. Struktur-Wirkungs-Beziehungen legen den Schluß nahe, daß BAPSA im Stoffwechsel in das in reiner Form unbekannte 2,3-Dimercaptopropan-1-sulfonamid überführt wird. Somit wäre BAPSA als "Pro-Drug" anzusehen.

Im Vergleich dazu zwingt die mangelnde Wirksamkeit des 1,3-Dithiolan-2-thion-4-sulfonamid (DTMSA), über dessen Darstellung hier ebenfalls erstmals berichtet wird, zu der Annahme, daß nicht jeder Thioester als Pro-Drug geeignet ist. Nach Hydrolyse sollte DTMSA ebenfalls in 2,3-Dimercaptopropansulfonamid überführt werden. Als Ursache für diesen Unterschied wird bei BAPSA die Stabilisierung der Wirkform durch Ausbildung einer fünfgliedrigen Ring-Struktur mit Arsen angesehen, die bei DTMSA in Form des zyklischen Trithiocarbonats bereits vorhanden ist.

Ebenfalls ohne nachweisbare Wirksamkeit unter in-vitro Bedingungen waren synthetisch hergestellte, niedermolekulare Oxidationsprodukte des DMPS (sog. Bisdisulfide). Die Gründe für diesen Unterschied

zum System MESNa / DiMESNa, bei dem von anderen Untersuchern eine Regenerierung der Thiolgruppen plausibel gemacht werden konnte (ORMSTAD 1983), können gegenwärtig nur vermutet werden. Dazu mag die bei der Synthese beobachtete, gegenseitige Umwandlung der verschiedenen oligomeren und polymeren Formen ebenso beitragen wie die denkbare Behinderung der intrazellulären Aufnahme durch die größere Molekülstruktur und -rigidität. Unwirksam war in diesen Versuchen auch D-Penicillamin, das gelegentlich zur Behandlung der Arsenvergiftung empfohlen wurde (KURUVILLA 1975).

Die Stabilität verschiedener Schwermetalladdukte der bekannten Arsenantidote 2,3-Dimercaptopropan-1-sulfonat (DMPS) und *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) wurde in einem in-vitro-Reaktionsmodell abgeschätzt. Dabei wurde die Neigung dieser Addukte zur Trithiocarbonatbildung als Stabilitätskriterium benutzt. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern ergab sich dabei eine herausragende Stabilität der Cd-Verbindung im Gegensatz zur labilen Pb-Verbindung. Für As und Hg lagen die gefundenen Reaktivitäten dazwischen.

B Allgemeiner Teil

1. Toxikologische Bedeutung des Arsens

In der Bundesrepublik hat die Bedeutung des Arsens seit dem weitgehenden, gesetzlichen Verbot der Verwendung arsenhaltiger Stoffe im Jahre 1958 stark abgenommen. Mit akuten Vergiftungen durch Arsen ist vor allem im gewerblichen Bereich zu rechnen. In der BRD ist in den letzten zehn Jahren jedoch kein einziger Fall bekannt geworden. Auch die Bedeutung chronischer Vergiftungen fällt überwiegend in den arbeitsmedizinischen Bereich, obwohl die Nachwirkungen des verbreiteten Einsatzes As-haltiger Stoffe vor dem generellen Verbot auch heute noch gelegentlich in der Allgemeinpraxis zu beobachten sind.

Die steigende Belastung der Umwelt, der Lebensmittel und des Trinkwassers durch As-haltige Nebenprodukte aus industriellen Prozessen beinhaltet ein schwer abschätzbares Risiko für die Allgemeinbevölkerung. Die toxikologische Bedeutung der low-dose-Exposition wird hauptsächlich abgeleitet aus teilweise schwierig zu interpretierenden, epidemiologischen Studien sowie aus tierexperimentellen Befunden, deren Relevanz für den Menschen unsicher ist. Im Vordergrund stehen dabei Spät- oder Langzeitwirkungen, die auf eine Akkumulation des Arsens im Körper (vgl. Abschn. 1.3) zurückgeführt und mit dem vermehrten Auftreten von Schäden in Lunge (Malignome), Haut (Hyperkeratosen, Malignome), Herz-Kreislaufsystem (Myokardschäden, periphere Durchblutungsstörungen) und Nervensystem (periphere Neuropathien, Hör- und Sehminderungen) belegt werden. Obwohl eine große Zahl von Studien auf die erhöhte Prävalenz dieser Erscheinungen bei belasteten Personen hinweist, bleibt die Übertragbarkeit dieser Befunde auf andere Gruppen fraglich. Bisher existieren nämlich keine ausrei-

chend abgesicherten Dosis-Wirkungsbeziehungen in diesem Konzentrationsbereich. Kanzerogenität, Mutagenität und Teratogenität von Arsen konnten im Tierversuch zwar nahegelegt, jedoch insbesondere bei geringen Dosen nicht zweifelsfrei bewiesen werden (UBA 1983).

Da für dem Arsen zugeschriebene Wirkungen ein Schwellenwert bislang nicht ermittelt werden konnte, wurde für den Umgang mit As-Verbindungen eine Technische Richtkonzentration (TRK) von 0.2 mg/m^3 und für Arbeitsstoffe, die mehr als 0.3 Gew.-% As enthalten, ein weitreichendes Verwendungsverbot verfügt (DFG 1982). Die tolerierbare Tagesdosis wurde von der WHO vorsorglich auf $2 \text{ } \mu\text{g}$ anorg. Arsen/kg Körpergewicht festgesetzt (WHO 1983).

Ebenfalls ungesichert ist, ob Arsen nicht doch ein notwendiges Spurenelement ist. Mangelercheinungen sind beim Menschen nicht bekannt, aber dies mag dem ubiquitären Vorkommen von Arsen zuzuschreiben sein. Es wurde berichtet, daß bei Ratten, die mit einer Spezialfuttermischung gehalten wurden, verminderte Fortpflanzungsfähigkeit, reduzierte Geburts- und Neugeborenenengewichte sowie eine erhöhte Neugeborenensterblichkeit auftraten, wenn der As-Gehalt im Futter unter 50 ppb lag. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe mit ca. 350 ppb As keines dieser Merkmale (ANKE 1977). In anderen Studien konnten jedoch keine essentiellen Arsenmengen ermittelt werden, so daß die notwendige tägliche Dosis für die Ratte sicher unter $2 \text{ } \mu\text{g}$ liegt (HOVE 1938; SCHROEDER 1966).

In einer umfangreichen Studie hat der Unterausschuß für Arsen des amerikanischen National Research Council die toxikologische Bedeutung des Arsens resümiert und in einem 17 Punkte umfassenden Katalog zur Untersuchung und Erforschung von As-Wirkungen die Bedeutung dieses Forschungszweiges unterstrichen (NRC 1977).

1.1 Eigenschaften, Vorkommen, Verwendung und Nachweis

Vom Arsen (Ordnungszahl 33) ist nur ein natürlich vorkommendes Isotop (^{75}As) bekannt, weitere zwölf wurden bislang bei Kernreaktionen identifiziert. Einige von ihnen werden als Tracer für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt und sind kommerziell verfügbar (SMITH 1973). Darstellung und Zerfall der gebräuchlichsten sind in Abb. 1 gezeigt.

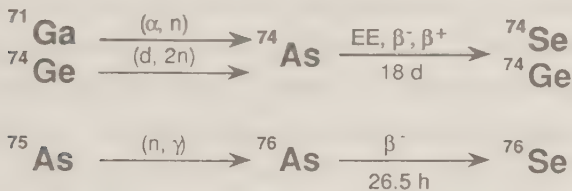


Abb. 1: Darstellung und Zerfall wichtiger Arsenisotope
(Zahlen in Klammern = Halbwertszeiten; EE = Elektroneneinfang)

Als Element der 5. Hauptgruppe des Periodensystems steht es zwischen Silicium (4. Hauptgruppe) und Selen (6. Hauptgruppe) und besitzt ausgeprägten Halbmetallcharakter (Elektronenkonfiguration $1s^2 2s^2 p^6 3s^2 p^6 d^{10} 4s^2 p^3$), was seine Verwendung in der Halbleiterindustrie erklärt.

In seinen Verbindungen ist Arsen gewöhnlich drei- oder fünfbändig mit formalen Oxidationsstufen zwischen -3 und +5. In der Natur findet es sich als Oxid oder Sulfid, gelegentlich auch gediegen, vor allem in

Erzen, wo es bei der Verhüttung (Rösten, Schmelzen u.a.) in Form des flüchtigen Trioxids freigesetzt wird. Auch in Kohlekraftwerken und Industriefeuerungen fallen beträchtliche Mengen von Arsenoxiden an, in der BRD ca. 60 t/a (geschätzt als As-Staubemission) (UBA 1983).

Der mittlere Arsengehalt der Erdrinde wird mit 2 ppm angegeben (WULLSTEIN 1971). In der Außenluft liegen die gemessenen As-Konzentrationen in nicht-industriellen Gebieten gewöhnlich unter $0.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (LEONARD 1980), während in der Hüttenindustrie Spitzenwerte über $20000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ registriert wurden (HINE 1977). Im Trinkwasser werden üblicherweise wie im Meerwasser 1 - 5 ppb Arsen gefunden, in industriellen Gegenden mit Trinkwassergewinnung aus Oberflächenwasser etwas mehr. Bestimmte Gegenden (z.B. Reichenstein, Schlesien) mit hohen Arsengehalten im Boden weisen stark erhöhte Werte bis zu $1100 \mu\text{g}/\text{l}$ auf (FOWLER 1977).

Die Weltjahresproduktion an As betrug zwischen 1975 und 1977 gleichbleibend jährlich ca. 60000 t (berechnet als As_2O_3) (WHO 1981). In der BRD wurden 1979 ca. 1080 t As_2O_3 verbraucht, davon etwa 250 t aus der Inlandsproduktion (TÜV RHEINLAND 1979, 1981). Es wird in der Halbleiterindustrie bei Herstellung von Transistoren, LEDs und Photoelementen, in der Glasindustrie als Entfärber, in der Metallurgie als Legierungsbestandteil, sowie bei der Herstellung von Pestiziden, Herbiziden, Farbstoffen und Feuerwerkskörpern verwendet (WINSHIP 1984).

Vor der gesetzlichen Einschränkung der Verbreitung arsenhaltiger Stoffe kam das Halbmetall auch in der BRD in zahlreichen Arzneimitteln vor. Solche Präparate, die um 1937 weltweit in ca. 8000 verschiedenen Zubereitungen angeboten wurden, fanden Einsatz bei der Behandlung von Anorexia, Arthritis, Asthma, Chorea, Diabetes,

Leukämien, Malaria u.a. durch Protozoen verursachten Erkrankungen, Neuralgien, Psoriasis, Syphilis, Tuberkulose und Wurmbefall (VALLEE 1960). Heute ist ihr Einsatz weitgehend obsolet, da für praktisch alle Indikationen wirksamere und besser verträgliche Alternativen verfügbar sind.

In der Veterinärmedizin enthielten zahlreiche Präparate gegen Parasiten sowie einige Desinfektionsmittel für Tauchbäder Arsenverbindungen. In der Tierzucht wurden Arsentrioxid und Phenylarsonsäurederivate in kleinen Dosen dem Futter zugesetzt, um Wachstum und Gewichtszunahme zu beschleunigen. In der Tierverwertung (Gerbereien u.a.) erfolgte der Einsatz von Arsenverbindungen zur Konservierung und Veredelung. In der Landwirtschaft wurden arsenhaltige Pestizide und Insektizide in großen Mengen versprüht, wobei im Weinbau sowie in Obst- und Gemüsekulturen die höchsten Gehalte gefunden wurden. In hohen Konzentrationen war Arsen auch in Holzschutzmitteln und in Mitteln zur Bodensterilisation enthalten (VALLEE 1960).

Obwohl diese Anwendungen weitgehend der Vergangenheit angehören oder der Arsengehalt in den Zubereitungen reduziert wurde, ist bei Produkten aus dem Ausland, wo nur unzureichende oder gar keine gesetzlichen Bestimmungen den Einsatz von Arsen im Agrar- und Lebensmittelbereich regeln, immer noch mit erhöhten Arsengehalten zu rechnen. In Tabakwaren z.B. wurden durch den Einsatz arsenhaltiger Insektizide bis zu 40 mg As/kg gemessen. Auch manche Fische, besonders wenn sie in küstennahen Gewässern gefangen wurden, weisen Gehalte bis zu 100 mg As/kg auf (LEONARD 1980). Nicht zuletzt muß auch daran gedacht werden, daß bestimmte Zusatzstoffe in Lebensmitteln mit Arsen kontaminiert sein können. So wurden z.B. durch Verwendung von Schwefelsäure, die nach dem Bleikammerv erfahren dargestellt wurde, beträchtliche Arsenmengen bei der Zuckerraffinierung, der

Malzherstellung, der Gewinnung von Zitronen-, Wein- und Phosphorsäure in die Nahrungskette eingeschleust.

Eine Übersicht über die rechtlichen und technischen Bestimmungen, die den Umgang mit Arsenverbindungen in der BRD regeln, ist vom Umweltbundesamt herausgegeben worden (UBA 1983).

Die Verwendung von Arsen in suicidal oder homicidal Absicht wird auch heute noch gelegentlich berichtet (HUTTON 1982). Über seinen Gebrauch als Aphrodisiakum oder Geriatrikum liegen keine verlässlichen Angaben vor.

Für den Nachweis von Arsen stehen heute empfindliche, analytische Methoden zur Verfügung, die quantitative Bestimmungen im ppb-Bereich erlauben. Die klassischen Methoden nach Bettendorf, Gutzeit, Marsh, Reinsch und Thiele finden nur noch selten Anwendung, aber modifizierte Formen dieser Verfahren sind immer noch als "screening tests" bedeutsam. Moderne Nachweismethoden sind die Plasmaemissionsspektroskopie (≤ 0.1 mg/kg), die Atomabsorptionsspektroskopie (Nachweisgrenze ≤ 40 ng) und die Neutronenaktivierung (≈ 0.1 ng) (ISHINISHI 1986, WINSHIP 1984).

1.2 Giftigkeit verschiedener Arsenverbindungen

Systematische Aussagen über die Giftigkeit der zahlreichen As-Verbindungen sind nur eingeschränkt möglich. Da die Giftwirkung einerseits eine deutliche Abhängigkeit vom Eintrittsort und vom Konzentrations-Zeit-Produkt des Giftes zeigt, andererseits durch Stoffwechsel-

parameter beeinflusst wird, die deutliche Speziesunterschiede aufweisen, ist jede Verallgemeinerung oder Übertragung von Versuchsergebnissen von einer Tierart zur anderen bzw. auf den Menschen kritisch zu beurteilen.

Aus praktischer Sicht mag jedoch folgende Faustregel für zunehmende Toxizität dienen (WINSHIP 1984):



a) **Arsenwasserstoff**

Arsenwasserstoff (Arsin) ist gasförmig (Sdp. - 62.48 °C) und fällt als Zwischenprodukt bei der Darstellung von hochreinem Arsen für die Halbleiterindustrie an. Es bewirkt nach Inhalation eine schwere Hämolyse mit Abdominalschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Ikterus und Hämoglobinurie sind die Vorboten des akuten Nierenversagens, das in etwa einem Drittel der bislang beschriebenen Fälle zum Tode führte. Daneben wurden Herzversagen und Lungenödem beobachtet (WINSHIP 1984). Konzentrationen von 3 - 10 ppm, eingeatmet über mehrere Stunden, erzeugen bereits Kopfschmerzen, Übelkeit und Parästhesien. Bei 250 ppm kann eine 30 Minuten dauernde Inhalation bereits zum Tode führen. Nach Exposition werden die höchsten Arsenkonzentrationen in Leber, Lungen und Nieren gefunden. Wird das Nierenversagen überlebt, dann bleiben häufig Myokardschäden und Leberfunktionsstörungen noch mehrere Monate lang nachweisbar (VALLEE 1960). Der genaue Mechanismus der Vergiftung ist ungeklärt. Diskutiert wird vor

allem eine toxische Akkumulation aktiver Sauerstoffspezies infolge einer Blockierung zellulärer Peroxidasen (Katalase, Dismutase etc.), die schließlich zur Lyse der Erythrozyten führt (JUNG 1939). Therapeutische Maßnahmen mit SH-Verbindungen sind in ihrer Wirksamkeit umstritten, die Therapie ist daher symptomatisch (ISHINISHI 1986). Für den Umgang mit Arsin besteht ein MAK-Wert von 0.05 ppm, entsprechend 0.2 mg/m^3 (GefStoffV v. 26. 8. 86, BGI I, p1470).

Organische Derivate von Arsin sind beschrieben. Sie sind jedoch überwiegend oxidationsempfindlich und haben keine besondere toxikologische Bedeutung.

b) As(III)-Verbindungen

Eine wichtige Rolle spielen bei den dreibindigen As-Verbindungen die Oxo- und Halogenderivate. Von den letzteren haben besonders die Chlorverbindungen als Ausgangsmaterial zur Darstellung einer Vielzahl von Arsenverbindungen und als chemische Kampfstoffe Interesse gefunden. Im Kontakt mit Wasser hydrolysieren alle Halogenoderivate, wenn auch langsamer als die analogen Phosphorverbindungen, so daß die vorliegende Darstellung im folgenden auf die Oxoderivate beschränkt bleibt.

Das wichtigste von ihnen ist das Trioxid As_2O_3 (Arsenik), ein farb- und geruchloser Feststoff, der beim Rösten von arsenhaltigen Erzen (Buntmetalle) mit dem Flugstaub in die Umwelt gelangt und als Abfallprodukt Eingang in viele Fertigungsprozesse gefunden hat. Seine leichte

Zugänglichkeit und weite Verbreitung (neben seiner legendären Verwendung als homicidales und suicidales Mittel gehörte es zur Standardarznei der alten Medizin) haben es zu einer intensiv untersuchten Substanz gemacht. Die tödliche Dosis für den Menschen liegt im Bereich von 70 – 180 mg (VALLEE 1960). Obwohl As_2O_3 erst bei $272^\circ - 313^\circ\text{C}$ (je nach Modifikation) schmilzt, setzt infolge des genügend hohen Dampfdruckes bereits bei niedrigeren Temperaturen merkliche Sublimation ein. Mit Wasser entsteht arsenige Säure, $\text{As}(\text{OH})_3$, deren Salze (Arsenite, Arsenate-(III)) im Falle der Alkali-, Erdalkali- und einiger Schwer- und Buntmetalle gut bekannt sind und in der Schädlingsbekämpfung sowie als Farben verwendet wurden. Die Löslichkeit von As_2O_3 in Wasser beträgt 2.1 g / 100 g bei 25°C , es ist bemerkenswert lipophil (NRC 1977). Die Giftigkeit der dreibindigen Oxoderivate wird in Abschnitt 2 ausführlich behandelt.

Verbindungen, in denen eine oder mehrere Hydroxylgruppen der arsenigen Säure durch organische Reste ersetzt sind, gehören zur großen Klasse der dreibindigen Organoarsensubstanzen (RAsO , $\text{R}_2\text{As}(\text{OH})$, R_3As). Von diesen hat das Phenylarsenoxid ein gewisses Interesse zur Blockierung zellulärer SH-Gruppen (z.B. HERTEL 1985, KAPLAN 1985) sowie bei Untersuchungen zum Mechanismus der Vergiftung mit As^{III} (KNOWLES 1985) gefunden. Toxikologisch ist es von untergeordneter Bedeutung. Organoarsenoxide sind ferner als Zwischenprodukte der Hydrolyse von Organoarsenhalogeniden identifiziert worden (FIESER 1968). Methylarsenhydroxyverbindungen wurden als Metaboliten nach Vergiftung mit As_2O_3 nachgewiesen (vgl. Abschn. 2.2).

c) As(V)-Verbindungen

5-bindige Arsenverbindungen sind ebenfalls toxisch, auch wenn sie als 5 – 10fach weniger giftig gelten als ihre dreibindigen Analoga. Das Oxid, As_2O_5 , ist besser wasserlöslich (630 g/kg) als das Trioxid und bildet in Wasser Arsensäure, H_3AsO_4 , die stärker oxidierend wirkt als Phosphorsäure, ansonsten dieser im chemischen Verhalten weitgehend gleicht. Im Stoffwechsel werden Arsenatreste ähnlich wie Phosphatrete z.B. an ADP oder Glucose gebunden. Im Gegensatz zur leidlich stabilen, energiereichen Phosphatbindung sind die gebildeten Arsenatester sehr labil, so daß γ -As-ATP spontan hydrolysiert und die chemische Energie ungenutzt als Wärme "verloren" geht (sog. Arsenolyse) (VALLEE 1960). Bei der metabolischen Entkopplung durch As(V) ist möglicherweise noch ein nicht-hydrolytischer Mechanismus bedeutsam (MITCHELL 1971).

Im Gegensatz zu den dreibindigen As-Verbindungen zeigen die fünfbindigen nur eine geringe Affinität zu Thiolgruppen, und die typischen Reaktionen mit Protein-SH-Gruppen werden hier nicht beobachtet. Anders als die große Zahl der durch dreibindiges As gehemmten Enzymsysteme scheinen durch As(V) nur wenige Enzyme beeinflussbar, z.B. Cytochrom-Oxidase oder Glycerin-Oxidase (JOHNSTONE 1963; LEONARD 1980). Allerdings wurde berichtet, daß Arsenat in vivo partiell zu dreibindigen Formen reduziert wird, was ebenfalls zur Toxizität beitragen würde (GINSBURG 1963, 1965). Die Salze der Arsensäure ähneln in ihrer Wasserlöslichkeit den Arseniten, d.h. den gut löslichen Alkalisalzen stehen die weniger löslichen Erdalkali- und Buntmetallverbindungen gegenüber, aber sie gelangen offenbar im Gegensatz zu den Arseniten leicht ins ZNS (VALLEE 1960). Obwohl bei Verbrennungsprozessen die Oxidation nur bis zur dreiwertigen Stufe läuft, werden

Arsenite in Anwesenheit von Sauerstoff in biologischen Systemen anscheinend in beträchtlichem Ausmaß in fünfbindige Formen umgewandelt (BENCKO 1976). Thermodynamische Untersuchungen haben sogar ein Vorherrschen des fünfwertigen Zustandes unter physiologischen Bedingungen ergeben (FERGUSON 1972).

Fünfbindige Organoarsenverbindungen zeigen eine vergleichsweise geringe Toxizität. Ihre geringe Affinität zu SH- und OH-Gruppen werden dafür ebenso ursächlich angesehen wie ihre rasche Exkretion. Für Arsanilsäure, (Neo-) Arsphenamin, Carbarson, Tryparsamid u. ä. sind Vergiftungsfälle bekannt geworden. Diese Substanzen sind wegen ihrer Verwendung als Herbizide, Pestizide und Antiprotozoenmittel daher auch gelegentlich in experimentellen Studien eingesetzt worden. Die berichteten Ergebnisse lassen jedoch keine einfache Deutung zu und tragen zur Klärung des As(V)-Stoffwechsels nur wenig bei.

d) Metabolisch inerte As-Verbindungen

Schließlich sollen noch die sog. inerten Verbindungen erwähnt werden, von denen unter den anorganischen die Sulfide, unter den organischen solche vom Typ des Arsenobetain zu nennen sind. Diese Verbindungen werden entweder nicht resorbiert oder zeigen nach Inkorporation keinerlei Wirkung oder metabolische Veränderung. Tetraalkylarsoniumderivate finden sich vor allem in Meerestieren. Arsenocholin wurde von Ratten - offenbar ohne nachteilige Wirkung - in Lecithine eingebaut (WELCH 1942).

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über einige typische Eigenschaften verschiedener Gruppen von Arsenverbindungen (Tab.1). Dabei

ist anzumerken, daß aufgrund der enormen stofflichen Variabilität keine scharfen Trennungen der einzelnen Gruppen möglich sind. Ebenso wenig kann hieraus auf die Giftigkeit im Einzelfall geschlossen werden.

	Hydrophilie	Membran- gängigkeit	biol. HWZ im Säuger- organismus	Affinität zu SH-Gruppen	Metaboli- sierung u. Biotrans- formation
anorg. As(III) z.B. As_2O_3 , NaAsO_2	+	+	lang	++	++
org. As(III) $\text{As}=\text{O}$, $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$ 	+	++	mittel	+	+
anorg. As(V) z.B. As_2O_5 , Na_2HAsO_4	++	±	kurz	-	++
org. As(V) z.B. $(\text{CH}_3)_2\text{AsF}_3$	+	+	kurz	-	+
inerte As-Verbindungen z.B. Arsenobetain	±	±	versch.	-	-

Tab.1: Typische Eigenschaften verschiedener Klassen von Arsenverbindungen

++ = hoch += mäßig -= gering

Für Salze org. As(III)- und As(V)-Verbindungen ergeben sich naturgemäß
starke Abweichungen bei einzelnen Parametern

1.3 "Normalwerte" von Arsen beim Menschen

Die im Vergleich vieler As-Gehaltsbestimmungen beobachteten, deutlichen Schwankungen der Meßwerte werden teils auf unterschiedliche Methoden bei Probennahme, -aufbereitung und Messung, teils auf die Natur der resorbierten Arsenverbindung(en) zurückgeführt. Eine Standardisierung ist gegenwärtig wegen der komplizierten Analytik sowie aufgrund des Fehlens eines Stoffwechsel- und Verteilungsmodells für As im Organismus nicht in Aussicht.

Die Werte für das Gesamtkörperarsen des erwachsenen Menschen werden mit 3 - 4 mg angegeben, wovon ca. 99 % peroral und 1% durch Inhalation resorbiert wurden und wobei mit zunehmendem Lebensalter die Werte ansteigen (NRC 1977, p24). (Zum Vergleich: Fe 4000 - 5000 mg, Zn 1400 - 2300 mg, Cu 100 - 150 mg, Jod 10 - 20 mg, Mn 12 - 20 mg, Mo 10 - 20 mg, Cr $\approx$ 6 mg, Co $\approx$ 1 mg (BRAY 1974)).

Durch Trinkwasser werden monatlich etwa 0.3 mg Arsen aufgenommen. Die zulässige Belastung des Trinkwassers beträgt innerhalb der EG-Staaten 50 $\mu\text{g/l}$ (WINSHIP 1984), in der BRD sind gemäß Trinkwasserverordnung 40 $\mu\text{g/l}$ erlaubt (UBA 1983). Die durchschnittliche Arsenaufnahme durch Nahrungsmittel und Getränke in nicht-belasteten Gegenden Österreichs wurde auf 0.8 mg/Monat geschätzt (WOIDICH 1979), ein Wert, der aufgrund ähnlicher Lebensverhältnisse mit Vorbehalt auch für die BRD angesetzt werden dürfte. Für Großbritannien wurde die mittlere Tagesaufnahme pro Kopf mit 89 μg Arsen angegeben, wobei der Anteil an anorg. Arsen bei 25 % lag (MAFF 1982). Verzehr von Innereien, Fischen und Krustentieren führt zu höheren Werten, wenngleich hierbei vorwiegend metabolisch inerte Organoarsenverbindungen (z.B. Arsenobetain, Arsenocholin) aufgenommen werden, die rasch zur Ausscheidung gelangen (CANNON 1979). Inse-

samt bleibt die durch Nahrungsmittel bedingte Arsenzufuhr des Menschen gewöhnlich unter 1 mg/Monat, was eine mittlere Gesamtaufnahme von ca. 1.3 mg/Monat bedeutet (UBA 1983, p198). (Für Frankreich, Großbritannien, Kanada und USA sind Werte von 25 - 33 µg/kg u. Tag angegeben worden, entsprechend 53 - 69 mg/Monat (WHO 1973). Eine Erklärung für diese Diskrepanz gibt es nicht.) Die Resorption von Arsen durch Inhalation (ca. 11 µg/Monat) oder perkutan in nicht belasteten Gebieten fällt demgegenüber nicht ins Gewicht. Der Konsum von 20 Zigaretten/Tag führt jedoch zu einer Steigerung der monatlichen As-Aufnahme um ca. 0.7 mg (VALLEE 1960; UBA 1983). Im Blut von nicht-belasteten Personen lagen die gemessenen As-Gehalte üblicherweise bei wenigen µg/kg Vollblut. Da im Gegensatz zur Ratte beim Menschen offenbar keine Akkumulation von As im Erythrozyten erfolgt, liegen die Werte für Plasma und Serum im gleichen Bereich. Eine Beziehung zwischen Gesamtkörperarsen und Blutspiegeln existiert offenbar nicht, da beim Menschen die Halbwertszeit von As im Blut kurz im Vergleich zum Ganzkörper ist, ausgenommen bei kontinuierlicher und gleichbleibender Exposition (WHO 1981).

Im Urin liegen die As-Konzentrationen bei nicht-belasteten Personen üblicherweise unter 50 µg/l. Gewöhnlich wird dabei die Arsenmenge auf den Kreatiningehalt bezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher 24 h-Urinmengen zu erlangen. Typische Werte für zufällig ausgewählte Personen (Stadtbevölkerung) in Schweden, BRD und Italien ergaben breite Verteilungen mit Mittelwerten um 10 µg Gesamtarsen/g Kreatinin (VAHTER 1986; APEL 1983; FOA 1984). Die regelmäßige Bestimmung von As im Urin ist ein übliches screening-Verfahren bei Verdacht auf Exposition und zur Überwachung, da As größtenteils im Urin eliminiert wird und ein meßbarer Anstieg bereits wenige Stunden nach einmaliger Gabe von Arsen beobachtet wird. Daß

Größe und Ausmaß des Anstiegs von der Natur der aufgenommenen As-Verbindung und ihrer Biotransformation stark beeinflußt werden, schränkt die Aussagekraft jedoch erheblich ein (WHO 1981).

Arsen-Bestimmungen in "unbelasteten", menschlichen Organen und Geweben ergaben Werte um 50 µg/kg Trockengewicht, wobei Hirn, Herz, Magen, Milz und Thymus darunter, Lunge und Haut geringfügig darüber lagen (LIEBSCHER 1968). Deutlich höhere Werte ergaben sich für Haare (460 µg/kg) und Nägel (280 µg/kg), was mit dem hohen Keratingehalt und der chemischen Affinität von As-Verbindungen zu Sulfhydrylgruppen in Zusammenhang gebracht wird. Unter bestimmten Vorkehrungen gestattet die durch das Längenwachstum von Haar und Nagel mögliche ortsabhängige Bestimmung von As Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf einer stattgefundenen Exposition (FORSHUFVUD 1964).

2. Vergiftung mit As_2O_3 als Modellfall

Obwohl Arsenik zu den altbekannten Giftsubstanzen gehört, gibt es auch heute noch kein allgemein akzeptiertes Stoffwechselmodell trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet. Angesichts der Fülle vorliegender Befunde sprechen dennoch gute Gründe dafür, die Vergiftung mit Arsenik (As_2O_3) als ein geeignetes toxikologisches Modell anzusehen, dessen typische Merkmale wichtige Implikationen für die Toxikologie anderer Schwermetalle beinhalten:

- 1) das Gift ist eine physiko-chemisch wohl definierte Substanz, die ubiquitär vorkommt,
- 2) im Vergiftungsfall lassen sich in Abhängigkeit der resorbierten Dosis akute, subakute und chronische Verlaufsformen unterscheiden,
- 3) die Giftwirkung besteht in der Störung oder Blockierung zentraler Stoffwechselfunktionen in fast allen Organen und Geweben,
- 4) für die Giftwirkung existiert ein mechanistisches Modell,
- 5) durch diesem Wirkungsmodell entsprechend maßgeschneiderte Antidote läßt sich die akute Vergiftung erfolgreich therapieren und
- 6) das Gift ist im Organismus gut nachweisbar.

Untersuchungen zur Arsenikvergiftung sind in vivo an einer ganzen Reihe von Versuchstieren und Organen, in vitro an Zellkulturen, Homogenaten und mit definierten Enzymsystemen durchgeführt worden. Die Vielzahl der erhobenen Befunde lassen den Schluß zu, daß die Giftwirkung von Arsen in praktisch allen Organen und Geweben beobachtet werden kann. Es gibt somit für Arsen kein ausgesprochenes Ziel-

organ, wenn auch die Empfindlichkeit verschiedener Gewebe deutliche Unterschiede gegenüber Arsen zeigt und das Konzentrationsmuster den stoffwechselaktiven Organen (Leber, Niere etc.) eine Schlüsselrolle bei der endogenen Entgiftung zuweist. Für die chronische Exposition und die Spätfolgen der akuten Intoxikation ist dies offenbar von untergeordneter Bedeutung. Die Rückführung dieser Mannigfaltigkeit auf das traditionelle Modell der Blockierung des zellulären Energiestoffwechsels erscheint in diesem Zusammenhang als unzulässige Vereinfachung, und neuere, zellbiologische Arbeiten haben zur Entdeckung einer wachsenden Anzahl "neuer" Arsenwirkungen geführt. Solange jedoch der therapeutische Einfluß der bekannten Antidote auf diese Phänomene nicht bekannt ist, bleibt die Erprobung am blockierten Energiestoffwechsel ein wesentlicher experimenteller Bestandteil bei der Suche nach besseren Antidoten. Einzelheiten über einige Wirkungen von Arsen auf zellulärer und molekularer Ebene finden sich in Abschnitt 2.3. Zuvor sollen jedoch das klinische Bild der Arsenikvergiftung sowie die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse über das Schicksal von Arsenverbindungen in verschiedenen Organen und Geweben skizziert werden.

2.1 Klinik der Arsenvergiftung

Die akute Vergiftung durch Arsen wird nur noch sehr selten beobachtet, wobei neben der irrtümlichen Einnahme von arsenhaltigen Stoffen meist eine suizidale oder homicidale Absicht die Ursache ist (HUTTON 1982). Jedoch treten auch heute noch Fälle von As-induzierten Spätkomplikationen auf. Daher sollen im folgenden die vielfältigen,

klinischen Manifestationen einer Vergiftung mit Arsen dargestellt werden. Die dabei beobachtete Symptomatik hängt stark von der Resorptionsweise ab, so daß die Diagnose schwierig sein kann, wenn nicht anamnestische Angaben den Weg weisen.

a) Akute Vergiftung

Nach Inhalation As-haltiger Stäube treten Husten, Dyspnoe und Thoraxschmerzen auf. Die Schleimhäute zeigen Reizerscheinungen im Sinne einer Mucosaentzündung, Laryngitis, Tracheitis und milden Bronchitis bereits wenige Stunden nach Beginn der Exposition. Gastrointestinale Symptome werden nach Inhalation nur in geringem Maße beobachtet (ISHINISHI 1986).

Nach Ingestion von As_2O_3 oder Arsenitlösungen in akut-toxischen Dosen ($> 10 \text{ mg As/Mensch}$) stehen Reaktionen des Magen-Darm-Traktes im Vordergrund: Erbrechen, Durchfälle (z.T. blutig) und Übergang in einen schockartigen Zustand infolge des massiven Flüssigkeitsverlustes mit Kollaps und Koma gehören zum typischen Bild der akuten Vergiftung. Dieser Zustand, der durch kardiovaskuläre Störungen (Störungen der Herzfunktion und der Zirkulation bes. im Splanchnicusgebiet infolge der Wirkung von As_2O_3 als Kapillargift) verschlimmert wird, führt dann häufig zum Tode. Als tödliche Dosis für den Menschen wird die einmalige Aufnahme von 70 - 180 mg As_2O_3 p.o. angesehen (VALLEE 1960). Bei milderem Verlauf treten Fieber, Schlaf- und Appetitlosigkeit sowie Herzfunktionstörungen, Leberschwellung und Hauterscheinungen (As-Dermatitis), besonders im Gesicht, in den Vordergrund (WHO 1981).

Zu den Spätschäden zählen bowenoide Keratosen und periphere Neuritiden, wobei die Latenzzeit der ersteren im Mittel bei 30 Jahren, bei letzteren im Bereich von Wochen bis Monaten liegt. Auch das in epidemiologischen Studien gesicherte, vermehrte Auftreten von Lungencarcinomen weist Latenzzeiten von vielen Jahren auf. Lungencarcinome und Malignome der Haut stellen den größten Anteil der auf As-Wirkung zurückgeführten Metaplasien dar, gefolgt von Leukämien und Hä-mangiosarkomen (LEYH 1985). Bemerkenswert ist, daß diese Schäden häufig lange nach Beendigung einer gelegentlich sehr kurzen Exposition auftreten können, wenn die As-Konzentrationen im Körper längst wieder im Normbereich liegen. Eine einfache Dosis-Wirkungsbeziehung konnte dabei für die As-Exposition nicht gefunden werden (BLEJER 1976). Dies gilt insbesondere für Hautschäden. Hier werden zunächst vor allem ekzemartige Läsionen und Kontaktdermatitiden (z.B. bei beruflicher Exposition) beobachtet, zeitlich gefolgt von Hyperkeratosen, besonders der exponierten Hautareale, und - oft nach Jahren - von einer Arsenomelanosis oder einer fleckigen Depigmentation des Rumpfes. Auf die Bedeutung dieser Erscheinungen als Vorstufen der Entstehung von Hautmalignomen wurde bereits hingewiesen. Von gewissem diagnostischem Wert ist das Auftreten weißer Querstreifen an den Fingernägeln (sog. Mees-Streifen). Die Präferenz von As_2O_3 für die Haut wird mit dem hohen SH-Gehalt der Keratinschicht begründet (VALLEE 1960).

b) Subakute und chronische Vergiftung

Die oben genannten Spätfolgen werden sämtlich auch bei der subakuten und chronischen As-Vergiftung beobachtet. An den Schleimhäuten imponiert die chronische Vergiftung durch As_2O_3 zunächst als meist

milde Entzündung mit Rötung, Schmerz und Schwellung (Gesichtsödem). Über die Perforation des knorpeligen Nasenseptums wurde gelegentlich bei der gewerblichen Belastung durch Inhalation As-haltiger Stäube berichtet (NRC 1977). Ein wichtiges Zeichen der chronischen Arsenikvergiftung ist die periphere Polyneuropathie, gekennzeichnet durch Parästhesien, bisweilen motorische Paralysen, und Schmerzen infolge ein- oder beidseitiger Neuritiden nicht selten aller Extremitäten.

Auch Schädigungen der blutbildenden Organe sind als Arsenwirkung beim Menschen beschrieben worden (TERADA 1960; KYLE 1965; WESTHOFF 1975; FEUSSNER 1979). Dabei imponiert vor allem eine Störung der Erythropoiese mit Anstieg der δ -Aminolaevulinsäure im Urin. Auch megaloblastische Veränderungen sind beobachtet worden. Selten wurde auch bei schwerer Granulocytopenie Arsen als Ursache genannt, obwohl dies nicht zweifelsfrei erwiesen ist. Die Störungen der Erythropoiese konnten im Tiermodell reproduziert werden (BYRON 1967; MAHAFFEY 1977).

Als Manifestationen an inneren Organen werden in der Hauptsache Leberschädigungen sowie Gefäß- und Myokardschäden genannt, während gastrointestinale Symptome bei der chronischen Vergiftung offenbar von untergeordneter Bedeutung sind. Leberschwellung mit unspezifischer Veränderung des Enzymmusters im Sinne einer entzündlichen Parenchymschädigung sind nur vage Merkmale, bisweilen werden sie von Ikterus und Ascitesbildung begleitet. Gelegentliche Berichte über As-induzierte Zirrhosen könnten in den meisten Fällen auch andere Ursachen haben (z.B. Konsum As-haltiger Alkoholika) (AXELSON 1978, LÜCHTRATH 1983). Die Häufung hepatobiliärer Tumoren als Spätfolgen wurde bereits erwähnt. Myokardschäden werden aus den beobachteten EKG-Veränderungen (QT-Verlängerung, ST-Senkung) abgeleitet, aber der pathophysiologische Mechanismus und der ursächliche Zusammen-

hang sind keineswegs geklärt. Dagegen sind Gefäßschädigungen als Folge der As-Vergiftung gut gesichert in Übereinstimmung mit der experimentell nachgewiesenen Rolle von As_2O_3 als Kapillargift. Endangitis, Akrodermatitis und Gangrän der Extremitäten wurden nach Aufnahme von Fowler'scher Lösung (= 1.3% NaAsO_2) beschrieben (BUTZENGEIGER 1949). Viele der genannten, klinischen Manifestationen persistieren oder entstehen noch lange nach Aussetzung der As-Exposition. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Denkbar wäre die verzögerte Metabolisierung und Elimination von As in geschädigten Stoffwechselsystemen ebenso wie die schleichende Umverteilung und Akkumulation in bevorzugten Organen.

c) Mutagenität, Teratogenität, Carcinogenität

Bei Untersuchungen zur Kanzerogenität, Teratogenität und Mutagenität konnten eindeutige Schwellenwerte der As-Konzentration bislang nicht festgestellt werden (LEONARD 1980).

Der Verdacht der Mutagenität von Arsen wird in erster Linie aus Chromosomenstudien an in vitro-Systemen (Lymphozytenkulturen etc.) abgeleitet (PETRES 1972; NORDENSON 1982). Obwohl auch neuere Untersuchungen einen mutagenen Effekt von NaAsO_2 (≈ 10 mg/kg) in somatischen Zellen bei der Maus ergaben, scheint damit jedoch kein Erbrisiko verbunden zu sein (DEKNUDT 1986).

Über die Teratogenität gibt es inzwischen zahlreiche tierexperimentelle Studien an Hamstern, Mäusen und Ratten, die für Arsenat und Arsenit Mißbildungen (z.B. Exencephalie, Mikrognathie, mißgeformte Rippen und Wirbel etc.) und erhöhte Abortraten berichten (HOOD 1972a, 1972b; HOLMBERG 1969; FERM 1971). Die kritische Phase

scheint dabei in der zweiten und dritten Schwangerschaftswoche zu liegen.

Die carcinogene Wirkung von Arsen wird hauptsächlich aus epidemiologischen Studien von Risikogruppen hergeleitet (WHO 1981). Erst kürzlich konnte im Tierversuch die cancerogene Wirkung demonstriert werden, und neuere Arbeiten sehen Arsen dabei als Tumor-Promoter oder Cocarcinogen an (DEKNUDT 1986).

2.2 Verteilung und Metabolisierung von Arsen

Tracerstudien ergaben, daß nach oraler Aufnahme einer einmaligen Gabe von radiomarkiertem As_2O_3 ca. 70 - 90% resorbiert wurden. Für die Inhalation wurde eine Resorptionsquote von 25 - 40% genannt (HOLLAND 1959). Für die perkutane Resorption liegen keine Zahlen vor. Dementsprechend finden sich die höchsten As-Konzentrationen zu Beginn der Exposition in der Mucosa des Magen-Darm-Traktes oder des Bronchialsystems und den Alveolen. Während aus dem unteren Magen-Darm-Kanal ein rascher Übertritt der aufgenommenen Dosis ins Blut, von dort aus vor allem in die Leber beobachtet wurde, werden für Lungen und die Epithelien des oberen MDK und Respirationstraktes längere Verweilzeiten angegeben, wobei die Dauer mit abnehmender Wasserlöslichkeit ansteigt (z.B. $\text{As}_2\text{O}_3 > \text{NaAsO}_2$). Schwerlösliche (Staub-) Partikel werden nach Inhalation offenbar in den Alveolarmakrophagen gespeichert (ISHINISHI 1986).

Nach dem Übertritt ins Blut, aus dem beim Menschen im Gegensatz zur Ratte das Arsen rasch wieder verschwindet, wird zunächst ein Anstieg der Arsenkonzentration (außer in der Lunge) vor allem in Leber

und Nieren registriert. Durch effektive Metabolisierung in diesen Organen gelangt bereits der größte Teil einer resorbierten Menge zur Ausscheidung durch die Nieren. Die Effizienz der metabolischen Entgiftung (Redoxreaktionen u. Methylierung) wird durch steigende Dosen beeinträchtigt, wobei das Toleranzphänomen der österreichischen Arsenikesser eine offenbar schlecht verstandene Ausnahme bedeutet. Bei der renalen Ausscheidung konnten experimentell 3 Phasen mit Halbwertszeiten von 2 h, 8 h und 192 h unterschieden werden (MEALEY 1959). Nach einer Einzeldosis NaAsO_2 wurden ca. 35% innerhalb von 48 h, größtenteils in methylierter Form, vom Menschen ausgeschieden. Bei kontinuierlicher Aufnahme niedriger Dosen über wenige Tage stieg die Ausscheidung im Urin auf 60 - 70% der täglichen Dosis an (BUCHET 1981a, 1981b; MAPPES 1977). Andere Wege der Elimination über Faeces, Schweiß, Haare, Nägel und Desquamation sind von untergeordneter Bedeutung.

Nicht ausgeschiedene Arsenmengen werden - größtenteils nach Biotransformation - rasch umverteilt in Organe, die gegenüber Arsen ein gewisses Speicherverhalten zeigen. Dazu gehören Haare, Nägel, Haut und Plattenepithelien sowie Nebenhoden, Schilddrüse, Augenlinse, Zähne und Knochen. Die Speicherformen sind nicht im einzelnen bekannt. Auf die Affinität dreibindiger As-Verbindungen zu Keratin-SH-Gruppen wurde bereits hingewiesen. Für das Skelett wird ein phosphat-analoger Einbau als Arsenat angenommen (LINDGREN 1982).

Die Hauptmetaboliten von As_2O_3 oder NaAsO_2 , die zur Ausscheidung gelangen, sind Dimethylarsinsäure DMA (TAM 1979) und Monomethylarsonsäure MMA (BUCHET 1981b; MAHIEU 1981; CRECELIUS 1977; TAM 1979). Die Metabolisierung erfolgt in unterschiedlichem Ausmaß in nahezu allen Geweben und Organen. Unzureichende Charakterisierung der eingesetzten Substanzen komplizieren diese Untersuchungen

ebenso wie fehlende analytische Differenzierungen der fraglichen Metaboliten, so daß nur in wenigen Fällen verläßliche Daten vorliegen (LUNDE 1973; REAY 1977; WHO 1981).

Weitgehend gesichert scheint, daß sowohl As(III)- als auch As(V)-Verbindungen in vivo durch Methylierung in fünfbindige Organoarsenderivate überführt werden. Noch nicht abschließend geklärt ist dagegen die Frage des Redoxwechsels zwischen III- und V-wertigem Arsen. Während thermodynamische Berechnungen unter physiologischen Bedingungen ein Vorherrschen der fünfwertigen Stufe plausibel machen, legen zahlreiche Studien zum Arsenmetabolismus den Schluß nahe, daß neben der Oxidation von Arseniten auch die Reduktion von Arsenaten im Säugetierstoffwechsel abläuft ($\text{III} \gg \text{V}$: MEALEY 1959; BENCKO 1976; VAHTER 1983; $\text{V} \gg \text{III}$: GORDON 1948; GINSBURG 1965; MCBRIDE 1978; VAHTER 1983; FISCHER 1985). Inwieweit hier Speziesunterschiede das Bild komplizieren, bleibt noch zu klären. Dimethylarsinsäure (Kakodylsäure) und Monomethylarsonsäure sind auch nach Verabreichung von markierten Arsenaten im Urin und Blut nachgewiesen worden (CRECELIUS 1977; TAM 1979). Ungeklärt ist, ob letztere eine Besonderheit des humanen Arsenstoffwechsels ist (WHO 1981). Weitere Aspekte der Biotransformation werden im folgenden Abschnitt erörtert.

2.3 Biochemie der Arsenvergiftung

Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der Vergiftung mit Arsen haben zahlreiche Details ans Licht gebracht, die zu einem Verständnis der Wirkungen von Arsen auf den Zellstoffwechsel bei-

getragen haben. Trotz umfangreicher Ergebnisse auf biochemischem Gebiet ist auf zellbiologischer Ebene die Komplexität der Arsenwirkungen bisher nur sehr lückenhaft untersucht worden. Auch die beobachtete Diversifizierung auf der Ebene der Organe und Gewebe ist bislang vor allem deskriptiv.

Nach heutiger Kenntnis lassen sich auf molekularer Ebene zwei verschiedene Prinzipien für die Wirkung von Arsen angeben (VALLEE 1960):

- 1) infolge der leichten Bildung von Thioarseniten zeigt das dreibindige Arsen eine große Affinität zu (Protein-)SH-Gruppen und gleicht darin anderen Schwermetallen (z.B. Hg),
- 2) als Homologes des Phosphors kann es an dessen Stelle in vielen Stoffwechselwegen eingebaut werden, ohne ihn jedoch funktionell ersetzen zu können. (Ob hierbei das Arsen analog dem Phosphat immer im fünfbindigen Zustand vorliegen muß, ist nicht hinreichend geklärt.)

Beides führt zu schweren Funktionsstörungen zellulärer Systeme, die sich teilweise in vitro nachahmen lassen. Bei der Ausbildung von Thioarseniten durch Bindung von As_2O_3 an Protein-SH-Gruppen wird eine große Anzahl von Enzymen in ihrer Aktivität gehemmt. Als Beispiele seien genannt D-Aminosäureoxidase, Monoaminoxidase, Urease, Glucoseoxidase, Cholinoxidase, Pyruvatoxidase, Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase, 2-Glutaminsäureoxidase, Fumarase, Pyruvatdehydrogenase, Citratspaltendes Enzym, Xanthinoxidase, NADH-Oxidase etc. Eine umfangreiche Aufzählung findet sich bei Webb (WEBB 1966). Während einzelne As-S-Bindungen relativ hydrolyseempfindlich sind, stehen bei einer Reihe von Enzymen zwei SH-Gruppen in räumlicher Nachbarschaft, so daß es zur Bildung von zyklischen Thioarseniten

kommt, die wesentlich stabiler sind. Untersuchungen mit Modellsubstanzen haben gezeigt, daß ein Maximum an Stabilität beim 5-gliedrigen Ring vorliegt, beim 7-gliedrigen Ring die Stabilitätskurve ein Minimum durchläuft, um bei größeren Ringen wieder leicht anzusteigen (WHITTAKER 1947) (vgl. Abb. 6).

Der stabile 2-Arsa-1,3-dithian-Ring bildet sich leicht zwischen As_2O_3 und der reduzierten Form der Liponsäure (=6,8-Dimercaptooctansäure), so daß bei allen Enzymen mit diesem Cofaktor eine Inaktivierung durch As_2O_3 beobachtet werden kann. Liponsäure ist als Lipoamid Bestandteil einiger Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels der Zelle (z.B. Pyruvatdehydrogenase, α -Ketoglutaratdehydrogenase) und reagiert in der reduzierten Form direkt mit dreibindigen Arsenderivaten, die mindestens zwei Hydroxy- oder Halogenreste besitzen, zu den entsprechenden Arsadithianen (Abb.2).

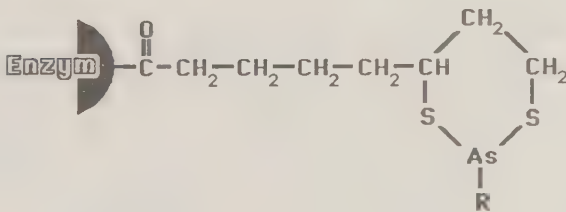


Abb. 2: Inaktivierung von Enzymen nach Blockierung des Lipoamid-Cofaktors durch Ringbildung mit R-As=O

a) **Einfluß von Arsen auf den Energiestoffwechsel**

Unter dem Einfluß von Arsenoxiden in μM -Bereich kommt es zu einer Hemmung des Energiestoffwechsels z.B. in Nierentubulizellen. Als Hauptursache wird auch hier die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase angesehen, deren Kofaktor Lipoamid blockiert wird (Abb.2). Dieser Stoffwechselblock hat zur Folge, daß Pyruvat nicht mehr in AcetylSCoA umgewandelt werden kann. Der Mangel an AcetylSCoA bringt alle abhängigen Stoffwechselwege zum Erliegen (z.B. den Krebs-Zyklus). Auch die Gluconeogenese aus Pyruvat wird unterdrückt, da das Regulatorenzym, die Pyruvatcarboxylase, allosterisch durch AcetylSCoA aktiviert wird (BARRITT 1976).

Neuere Untersuchungen zeigen, daß eine Reihe von Enzymen nach Reduktion eines intramolekularen Cystinrestes nicht direkt mit As_2O_3 reagieren. Zunächst werden hierbei im Gefolge von Elektronentransportvorgängen unter Beteiligung von NADH zwei Elektronen auf Arsenit übertragen (Reduktion zum Hypoarsenit). Zur Inaktivierung führt dann die Verbrückung der beiden Cysteine durch Hypoarsenit. Dies wurde in vitro am Beispiel der Glutathion-Reduktase und der Lipoamid-Dehydrogenase plausibel gemacht (KNOWLES 1982, 1985) (Abb.3).

Obwohl der vorgeschlagene Mechanismus einige experimentelle Daten erklären würde, bleibt eine Reihe von offenen Fragen:

- a) im Gegensatz zur gut gesicherten Chemie der Hypophosphite sind analoge Verbindungen vom Arsen bislang nicht bekannt,
- b) die analoge hypophosphorige Säure ist ein starkes Reduktionsmittel, das Disulfidbrücken sofort reduzieren würde und unter physiologischen Bedingungen nicht beständig wäre.

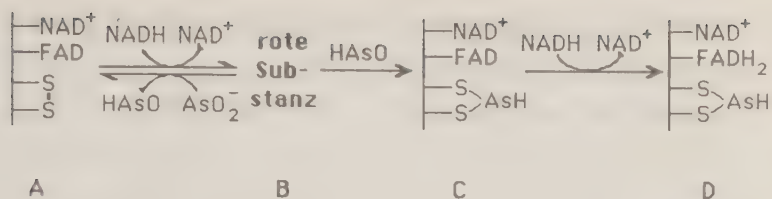


Abb.3: Vierstufiges Reaktionsmodell der Reduktion von Lipoamid-Dehydrogenase in Gegenwart von Arsenit. Die Reduktionsequivalente könnten auch durch Dithiole bereitgestellt werden, z.B. Dithiothreitol. Die Struktur der spektroskopisch nachweisbaren, roten Substanz ist unbekannt (modif. nach KNOWLES 1982).

Falls die Affinität der hypothetischen Hypoarsenite für SH-Gruppen tatsächlich größer wäre, würde der von Knowles vorgeschlagene Mechanismus eine alternative Erklärung für die in einigen Systemen beobachtete Giftung von Arseniten durch Thiol- und Dithiolverbindungen (z.B. BAL) bieten, wenn diese in stöchiometrischen Verhältnissen vorliegen bzw. vorinkubiert wurden. Bislang war dafür u.a. eine Vehikelfunktion (z.B. des BAL-Arsenit-Komplexes) angenommen worden (FLUHARTY 1961; GAINER 1972; PETERS 1955; SIEGAL 1967; WU 1965). In welchem Ausmaß solche Prozesse ablaufen könnten, ist unklar und wird wohl entscheidend von den Redoxpotentialen der beteiligten Komponenten abhängen. Intramolekulare Disulfidbrücken könnten durch Arsen auch nach Thiol/Disulfid-Austausch angegriffen werden (Abb. 4).

Die hohe Affinität zu SH-Gruppen ist eine typische Eigenschaft der dreibindigen Arsenderivate, während As(V)-Verbindungen offenbar

nicht direkt reagieren, sondern erst nach Reduktion (z.B. durch zelluläre Redoxsysteme) (JOHNSTONE 1963).

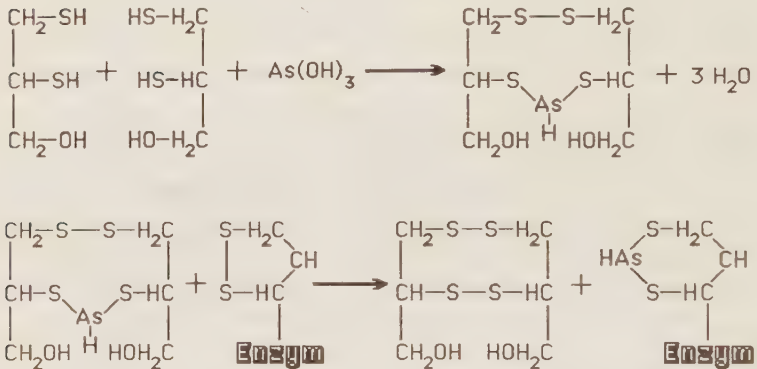


Abb. 4: Reduktion von Arsenit durch BAL mit anschließender Blockierung einer Enzym-Disulfid-Brücke durch den As-BAL-Komplex

b) Einfluß von Arsen auf zelluläre Informationsstrukturen

Die inhibitorische Wirkung von Arsenik betrifft nicht nur den Energiestoffwechsel der Zelle (z.B. Blockierung der Decarboxylierung von α -Ketosäuren), sondern auch die Informationsstrukturen der Zelle. So kommt es unter Wirkung von As_2O_3 zu einem Mitosestop, eine Eigenschaft, die in den 30er Jahren zum Einsatz von As_2O_3 als Zytostatikum führte (MOESCHLIN 1980). Der Mechanismus dieses Vorgangs ist offenbar komplex, wird aber ebenfalls der bekannten Affinität zu SH-Gruppen zugeschrieben (DUSTIN 1933). Im gleichen Zusammenhang

wird die Wirkung von Arseniten auf DNA-Synthese- und -Reparaturmechanismen gesehen. Eine Beeinträchtigung der DNA-Reparaturmechanismen durch Inhibition der Exzisionsvorgänge bei Strangkorrakturen konnte kürzlich in der Zellkultur demonstriert werden (OKUI 1986). Schon länger bekannt ist die Bindung von Arseniten an die DNA-Polymerase (JUNG 1970, 1971; WESTERNHAGEN 1970). Solche Störungen auf DNA/RNA-Ebene werden mit der Rolle von Arsenverbindungen als Klastogene, die zu Chromosomenstrangbrüchen und Punktmutationen führen, in Verbindung gebracht. Dies könnte die molekulare Basis für die dem Arsen zugeschriebene Wirkung als Mutagen, Teratogen und (Co-)Carcinogen sein. In diesem Sinne sind möglicherweise auch Berichte über eine Erhöhung der Strahlensensibilität in Zellkulturen unter Arsenwirkung zu interpretieren (BUMP 1986; LEE 1985), obwohl andere Autoren keinen Zusammenhang zwischen Arsen und Strahlenrisiko bestätigen konnten (BAKER 1970; MÜLLER 1986). Ob dabei As_2O_3 unmittelbar oder erst nach metabolischer Umwandlung (s. Abschn. 2.2) wirkt, ist nicht geklärt. Die mutagene Wirkung von Arseniten konnte im Tierversuch an somatischen Zellen verifiziert werden (DEKNUDT 1986).

Weiterhin wird diskutiert, ob Arsenite anstelle von Phosphatresten in Nukleinsäuren inkorporiert werden können (PETRES 1974). Daß die Gabe von Arseniten merkliche Störungen des Phosphatgehaltes in Geweben bewirken kann, wurde aufgrund neuerer in-vivo ^{31}P -NMR-Untersuchungen der Leber behauptet (CHEN 1986). Die effektiven Konzentrationen von Arsen für Störungen der Informationsstrukturen einer Zelle liegen jedoch um einen Faktor 10 - 100 höher als die zur Blockierung des Energiestoffwechsels nötigen, welche im μM -Bereich liegen. Die Bedeutung dieser Befunde im Hinblick auf die Biotransformation von Arseniten bleibt noch zu klären.

Im niederen (μM) Konzentrationsbereich führt Arsenit bereits zu deutlichen Veränderungen der Proteinsynthese. Dabei kommt es ähnlich wie bei anderen Schwermetallen zur Synthese von Stress-Proteinen, sog. heat-shock proteins, deren Bedeutung für den Zellstoffwechsel bislang nur unvollständig verstanden ist (CALTABIANO 1986). Der genaue Angriffsort des Metalls ist nicht bekannt, aber eine Störung des Energiestoffwechsels der Zelle scheint nicht wesentlich zu sein, da die genannten Proteine nicht bei Blockierung des mitochondrialen Energiestoffwechsels beobachtet wurden.

c) Einfluß von Arsen auf Mechanismen der zellulären Signalübertragung

Die inhibitorische Wirkung von Arsenoxiden (z.B. Phenylarsenoxid, PAO) betrifft auch Mechanismen der Signalübertragung in der Zelle. An Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß die Rezeptorendozytose, einer der ersten Schritte bei der zellulären Signaltransmission, durch PAO ($30 \mu\text{M}$) sowohl beim β -adrenergen als auch beim EGF-Signal wirksam gehemmt wurde (HERTEL 1985). Obwohl hierbei auch eine Störung des Energiehaushaltes (ATP-Depletion) beteiligt sein könnte, wiesen die Autoren durch Bindungsstudien eine Änderung der Affinitäten für Agonisten und Antagonisten in Gegenwart von PAO nach. Auf der anderen Seite konnten Kaplan und Mitarbeiter zeigen, daß PAO im gleichen Konzentrationsbereich zu einer Vermehrung von Bindungsstellen für α_2 -Makroglobulin-Protease-Komplexe, für Fe_2 -Transferrin und Mannose-terminale Glycoproteine ohne Änderung der Ligand-Rezeptor-Affinität führte, die aus einem zytoplasmatischen Vesikelpool in die

Plasmamembran eingebaut wurden. Dieser Vorgang erfolgte auch in ATP-depletierten Zellen (KAPLAN 1985). Inwieweit es sich hierbei um eine spezifische Arsenwirkung handelt, ist nicht bekannt, jedoch wird auch hier eine Beteiligung von SH-Gruppen angenommen.

3. Therapie der Arsenvergiftung

Vor der Einführung von BAL war die Arsenvergiftung ein schwer beherrschbares Problem, für das im Falle der Vergiftung mit organischen Arsenderivaten nur eine symptomatische, nach der Einnahme anorganischer Verbindungen nur bei unmittelbarem Eingreifen eine effiziente Therapie verfügbar war: durch die orale Gabe von Eisenmagma (eine Suspension aus $\text{Fe}(\text{OH})_3$ und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in Wasser) wurde nicht resorbiertes, anorganisches Arsen in ein schwer lösliches Präzipitat verwandelt werden, das durch Magenspülung entfernt werden konnte (BUNSEN 1834; LOCKEMAN 1911; SOLLMAN 1956). Heute ist die Gabe von Magma obsolet, während die Magenspülung eine wichtige Sofortmaßnahme nach der oralen Aufnahme von Arsen bleibt.

Die Einführung von BAL als Antidot ist beispielhaft für die systematische Entwicklung eines Pharmakons aufgrund biochemischer und pharmakologischer Untersuchungen und markiert den Beginn einer kausalen Therapie der Arsenvergiftung.

Obwohl in vitro hochwirksam, zeigten tierexperimentelle Studien und der klinische Einsatz sehr bald schwere Nebenwirkungen von BAL: (in der Reihenfolge des Auftretens bei der Katze) Blepharospasmus, Lacrimation, Salivation, Übelkeit, Erbrechen, Tremor, Krämpfe, Koma, Kreislaufkollaps etc. sind typische Symptome der akuten Intoxikation durch BAL, die teilweise auch beim Menschen beobachtet wurden (DURLACHER 1946; MODELL 1946). Die LD 50 von BAL wurde zunächst mit 113 mg/kg (0.9 mmol/kg) angegeben (Ratte, i.m.) mit deutlichen Unterschieden bei einzelnen Chargen (DURLACHER 1946; STOCKEN 1946). Weitere Nachteile von BAL sind vor allem die geringe Wasserlöslichkeit (ca. 5 g/100 g), die eine intravenöse Applikation erschwert, sowie der unangenehme Geruch. Die Verabreichung bei der

akuten Arsenvergiftung erfolgt als 10%ige Lösung in Erdnußöl (2.5 mg BAL/kg Körpergewicht) intragluteal und wird zur Vermeidung von Nebenwirkungen in den ersten beiden Tagen alle 4 Stunden, am 3. Tag alle 6 Stunden, dann 10 Tage lang zweimal täglich wiederholt (MOESCHLIN 1980).

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, einerseits die chemische Struktur von BAL zur Besserung der Nachteile zu modifizieren und andererseits andere Komplexbildner bei der Arsenvergiftung einzusetzen. Für Chelatbildner vom Polyamin- (z.B. NAPDA) oder Polycarboxylat-Typ (z.B. EDTA), die mit vielen zwei- oder mehrwertigen Kationen stabile Komplexe bilden, konnte jedoch eine Wirksamkeit bei der Arsenvergiftung nicht nachgewiesen werden. Zwar gibt es eine Reihe von Kasuistiken in der Literatur, in denen nach erfolgloser BAL-Medikation durch D-Penicillamin Beschwerdefreiheit erreicht wurde, doch ist diese Polypragmasie schwierig zu objektivieren, da die BAL-resistenten Symptome nicht notwendigerweise durch Arsen induziert sein müssen (KURUVILLA 1975; KJELDSBERG 1972). Systematische Untersuchungen zur Klärung dieses Sachverhaltes fehlen bislang.

Der gegenwärtige Stand der Arsentherapie räumt Antidoten vom Dithiol-Typ ausdrücklich den Vorrang ein. Daneben sind diese Verbindungen auch bei der Vergiftung mit Quecksilber(II)salzen mehr oder weniger gut wirksam, da auf molekularer Ebene offenbar eine gewisse Ähnlichkeit zur Arsenvergiftung besteht (APOSHIAN 1983).

Chemische Modifikationen am BAL-Molekül führten zu besser wasserlöslichen Verbindungen, die jedoch trotz besserer Verträglichkeit BAL bis heute nicht aus den Therapiestandards verdrängen konnten. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die derzeit am meisten favorisierten Dithiole und ihre pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu

BAL (APOSHIAN 1986). Auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Substanzklasse wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Dithiol	ED 50 * (mmol/kg)	LD 50 (mmol/kg)
$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{SH} \\ \text{DMSA} \end{array}$	0.037 (0.026, 0.047) **	13.73 (12.55, 15.94)
$\begin{array}{c} \text{Na O}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{SH} \\ \text{DMPS} \end{array}$	0.055 (0.026, 0.082)	6.53 (5.49, 7.71)
 $\begin{array}{c} \text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{SH} \\ \text{DMPPA} \end{array}$	0.022 (0.004, 0.040)	0.82 (0.80, 0.84)
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{SH} \\ \text{BAL} \end{array}$	0.169 (0.088, 0.325)	1.48 (0.60, 1.80)

Tab. 2: ED 50 und LD 50-Werte von verschiedenen Dithiolen bei der Maus, i.p.; *ED 50 bei einer letalen Dosis von Arsen (LD 99.9): Dithiolgabe 10 min nach der Applikation von 0.15 mmol Na-arsenit/kg, s.c.; ** (in Klammern: 2s-Grenzen) (modif. nach APOSHIAN 1986)

3.1 Antidote: Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Seit der Einführung von BAL sind schätzungsweise mehr als 300 Substanzen synthetisiert und als Antidote getestet worden. Zwar entdeckte man schon früh, daß derartige Verbindungen auch bei anderen Schwermetallvergiftungen wirksam sind (z.B. Quecksilber, Gold, Antimon, Bismut, Nickel) (GILMAN 1946; BRAUN 1946), aber die Bemühungen um eine Rationalisierung bei der Entwicklung neuer Antidote in der Schwermetalltherapie wurden erst 20 Jahre später intensiviert. Neben der Kardinalfrage, welcher Antidottyp für ein gegebenes Schwermetall optimal ist, spielte vor allem das Problem, welche chemische Struktur einem vorgegebenen Antidottyp die günstigsten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften verleiht, die Hauptrolle. Obwohl es unmöglich ist, die Fülle der in der Literatur vorhandenen Daten miteinander zu vergleichen, da die Versuchsanordnungen zu unterschiedlich sind, lassen sich doch gewisse Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirksamkeit aufstellen, die im folgenden für die Arsenikvergiftung näher erläutert werden.

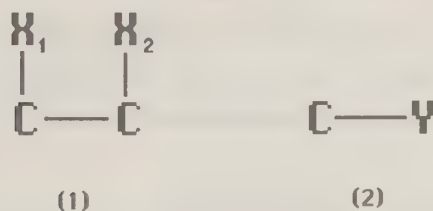


Abb. 5: Typische Strukturmerkmale eines Antidots gegen Arsen
(Erläuterungen im Text)

Typische Strukturmerkmale eines wirksamen Antidots gegen As_2O_3 (und einige andere Schwermetallverbindungen) sind in Abb.5 gezeigt. Dabei ist **1** die Metall-bindende Gruppierung (MBG), die mit Arsen eine Ringstruktur ausbildet, und **2** die "Seitenkette", die die Komplexbindung moduliert und eine Reihe pharmakologischer Parameter (z.B. Nebenwirkungen, Verteilung, Metabolisierung etc.) entscheidend beeinflusst.

a) **Einfluß der MBG auf die Metallbindung**

Die chemische Natur der MBG bestimmt maßgeblich die Affinität zum Metall bzw. die Komplexstabilität. Für Arsen ist bei hochwirksamen Antidoten $X_1 = X_2 = \text{S(H)}$. Ersatz einer oder beider SH-Gruppen durch andere Donorfunktionen (z.B. -OH, -NH₂, -COOH u.a.) verringert die Affinität zum Arsen erheblich (SMITH 1973), weshalb Monothiole bei Arsenvergiftungen schlechter oder gar nicht wirken. Für andere Elemente (z.B. Pb, Cu etc.) erhöht sich dagegen die Affinität, wenn eine Thiofunktion durch -NH₂ ersetzt wird. Bei Ersatz beider SH-Gruppen durch NH₂ geht die Affinität zum Arsen praktisch verloren, während viele Metalle (z.B. Cd, Co, Fe, Ni usw.) mit solchen Strukturen sehr stabile Komplexe bilden. Arsen verhält sich also in dieser Hinsicht anders als die typischen (Übergangs-)Metalle, was noch durch andere Beobachtungen gestützt wird (COTTON 1974):

- 1) ein As^{3+} -Kation ist unbekannt,
- 2) Arsen(III) vermag keine Komplexe mit Liganden zu bilden, die eine Stabilisierung durch d_π - p_π -Rückbindung erfordern (z.B. CO, PF₃),

- 3) Arsen fungiert in einigen Verbindungen (z.B. diars) selber als Donorligand.

Diese Befunde legen nahe, daß es sich bei der As-S-Bindung nicht um eine Donorbindung wie in typischen (Übergangs-)Metallkomplexen handelt, sondern um eine kovalente Bindung zwischen zwei Elementen ähnlicher Elektronegativität, die beide wegen der Verfügbarkeit unbesetzter d-Orbitale niedriger Energie Ladungen in beträchtlichem Ausmaß zu delokalisieren vermögen. Entscheidend für die bevorzugte Bildung dieser Bindung ist neben dem ausgeprägten Donorvermögen vermutlich die hohe Nukleophilie des (Thiol-)Schwefels. Diese ist aber ein kinetischer Parameter (vgl. die Diskussion darüber bei MARCH 1977, pp194, 323, 338), so daß die Reaktivität dieser Antidote gegenüber Arsen kinetisch kontrolliert wird.

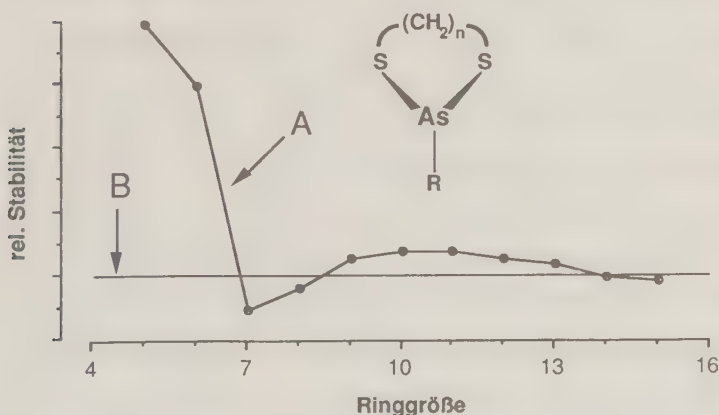


Abb. 6: Hypothetische, relative Ringstabilitäten von Thioarseniten aus Dithiolen und SH-Proteinen aus Reaktivierungsexperimenten (modif. n. WHITTAKER 1947)

A = cyclische Thioarsenite B = Protein-Thioarsenite

Die Reaktion von dreibindigem Arsen mit vicinalen Dithiolen führt zu stabilen, fünfgliedrigen 2-Arsa-1,3-dithiolanen. Auch 1,3-Dithiole reagieren und bilden 2-Arsa-1,3-dithiane. Systematische Untersuchungen zeigten, daß die Ringgröße großen Einfluß auf die Stabilität der Verbindung hat (WHITTAKER 1947). Offenbar ist der 5-Ring am stabilsten, beim 7-Ring durchläuft die Stabilitätskurve dann ein Minimum, ein Nebenmaximum liegt beim 11-Ring (Abb.6).

Neben der geringeren Ringstabilität besitzen 1,3-Dithiole durchweg eine größere Toxizität (PETERS 1945; PETRUNKIN 1959), so daß die vicinalen Analoga allgemein bevorzugt werden.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß die S-C-C-S-Gruppierung mit anderen Metallen ebenfalls stabile Bindungen eingeht (z.B. mit Ag, Au, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Zn) (BRAUN 1946; GILMAN 1946; VASILEVA 1959). Allerdings sind die Strukturen dieser Komplexe nur in wenigen Fällen gesichert, und theoretische Überlegungen deuten im Einklang mit experimentellen Befunden darauf hin, daß die Annahme einer fünfgliedrigen Ringstruktur wie beim Arsen in manchen Fällen unzutreffend ist (vgl. dazu die Strukturdiskussion für Hg-Komplexe bei BASINGER 1981). Es hat nicht an Bemühungen gefehlt, von solchen Komplexen die Stabilitätskonstanten zu bestimmen, um auf dieser Basis die Komplextherapie zu rationalisieren (BASINGER 1981a, 1981b; JONES 1981; NIGROVIC 1963; HELLER 1959). Dieses Vorhaben hat bislang nicht zum Ziel geführt, vermutlich aus mehreren Gründen:

- a) Für praktisch alle Metall-Thiolantidot-Verbindungen ist die Natur der in wässriger Lösung vorliegenden Strukturen unbekannt, und es gibt Hinweise darauf, daß in Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse verschiedene Komplexspezies existieren, deren Kon-

stanten nicht ohne weiteres unabhängig voneinander bestimmt werden können.

- b) Die zuverlässige Messung der Stabilitätskonstanten von Thiolkomplexen ist aufgrund von zahlreichen Nebenreaktionen (z.B. Oxidationsvorgänge, Elektrodenirreversibilitäten, etc.) schwierig.
- c) Für die Wahl des richtigen Antidots kann nicht allein die in-vitro Stabilität des vermuteten Komplexes entscheidend sein, sondern andere Einflußgrößen (Toxizität, Halbwertszeit, Verteilung, Spurenelementverarmung etc.) sind hierbei ebenso wichtig. So konnte am Beispiel der Hg-Vergiftung gezeigt werden, daß biologische Wirksamkeit und Komplexstabilitäten nur schlecht korrelierten (JONES 1980).

Bindungstheoretische Ansätze haben bisher keine Systematisierung der experimentellen Befunde zugelassen. Am ehesten noch eignet sich zur Voraussage wirksamer Antidotstrukturen das Konzept "weicher" und "harter" Säuren und Basen (PEARSON 1972). Dieses rein empirische Modell, das in Analogie zur Säure-Base-Theorie von Lewis von experimentellen Tatsachen ausgeht, daß bestimmte Reaktanden bevorzugt miteinander reagieren, ohne daß dafür stets stringente Kriterien angeführt werden können, ordnet Thiolgruppen und ihre Anionen den "weichen" Basen zu, die bevorzugt mit "weichen" Säuren (z.B. R-As^{III} , Hg^{2+}) reagieren, während "harte" Basen (z.B. -OH^- , -COO^-) mit "harten" Säuren (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) stabile Verbindungen bilden. Eine Reihe von Ausnahmen schränkt die universelle Anwendbarkeit dieses Konzepts jedoch ein.

Ungeklärt ist ferner die Frage, ob zur Metallbindung freie Thiolgruppen notwendig sind, da auch Disulfide und Thioether "weiche" Basen im Sinne von Pearson sind. Die Inaktivierung durch Disulfidbildung wird

als wichtige Nebenreaktion bei der Gabe von Dithiolen angesehen (BARRON 1947a). Im Falle der Lewisitvergiftung konnte gezeigt werden, daß auch substituierte Thiole wirksam sind, wobei offen blieb, ob die Substituenten in vivo unter Freilegung der SH-Gruppe(n) abgespalten wurden oder selbst zur Bindung des Metalls beitrugen (THOMSON 1947). Demgegenüber berichteten andere Autoren, daß veresterte (peracetylierte) BAL-Analoga im Tierversuch wenig toxisch, aber unwirksam bei der Mapharsid-Vergiftung waren (EVANS 1949b).

b) Der Einfluß der Seitenkette

Der Prototyp des Arsenantidots, BAL, ist selbst das Ergebnis einer Strukturvariation der Seitenkette (PETERS 1945). Schon von Beginn an hatte die Struktur der Seitenkette großes Interesse hervorgerufen, denn viele pharmakologische Parameter lassen sich in Abhängigkeit von der Größe, der Polarität und Reaktivität der Seitenkette steuern. Die Einführung ionischer Gruppen ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$) verbesserte die Wasserlöslichkeit erheblich, erhöhte die Ausscheidungsrate, verringerte die Toxizität deutlich, verschlechterte aber die Lipidgängigkeit und schränkte vermutlich dadurch auch den Verteilungsraum ein (geringe ZNS-Penetration) (APOSCHIAN 1983). Demgegenüber konnte durch Veresterung oder Veretherung, durch Aminierung oder Halogenierung zwar die Lipidgängigkeit erhalten oder sogar gesteigert werden, aber die meisten der untersuchten Verbindungen waren weniger wirksam oder stärker toxisch als BAL (EVANS 1949b; THOMSON 1947; CHENOWETH 1946; FITZHUGH 1946).

Ein anderer limitierender Faktor bei der Seitenkettenvariation war die chemische Stabilität der dargestellten Substanzen. Prominentes Beispiel ist BAL-glucosid, bekannt als BAL-Intrav, das zwar bei vergleichbarer Wirksamkeit wie die Stammverbindung eine sehr geringe Toxizität ($LD_{50} > 5000$ mg/kg; Kaninchen i.v.) und eine gute Wasserlöslichkeit besaß, sich jedoch in der Anwendung nicht durchsetzen konnte, da praktisch niemals größere Mengen in reiner Form erhalten und aufbewahrt werden konnte (DANIELLI 1946; JOHARY 1955b). Die geringe Stabilität derartiger Substanzen wurde in erster Linie der Reaktivität der freien Thiolgruppen zugeschrieben, da

- a) die fraglichen Verbindungen häufig in Form ihrer Acetylderivate rein dargestellt werden konnten,
- b) einige von ihnen nach erfolgter Deacetylierung als Ba^{2+} -Mercaptide stabilisiert werden konnten, die jedoch beim Versuch der Protonierung bereits weiterreagierten oder sich zersetzten.

Tatsächlich konnten in einigen Fällen Folgeprodukte isoliert werden, bei denen der Thiolschwefel mit anderen Teilen des Moleküls reagiert hatte (EVANS 1949a, 1949b; JOHARY 1955a).

Weitere Einzelheiten dazu werden in Abschnitt 5 ausgeführt.

3.2 vic-Dithiole mit Amidfunktion

Amide von Carbon- und Sulfonsäuren sind polare Substanzen, die im Falle niederer Molekulargewichte gute Lipidlöslichkeit mit beachtlicher Wasserlöslichkeit vereinen. In Gegenwart von Basen sind sie zur Ausbildung von Salzen befähigt (insbesondere Sulfonamide), wodurch ihre Wasserlöslichkeit beträchtlich ansteigt, was für die Infusionsthera-

pie bedeutsam sein kann. Im allgemeinen werden Amide nach oraler Gabe gut resorbiert und besitzen einen großen Verteilungsraum; sie überwinden die Blut-Liquor- und die Plazentaschranke. Die Metabolisierung besteht hauptsächlich in der N-Acetylierung in der Leber, die Hydrolyse der Amidgruppe erfolgt recht langsam und ist daher von untergeordneter Bedeutung. Wichtigster Eliminationsweg ist die renale Ausscheidung (MEYERS 1980).

Die akute Toxizität von Amidén ist häufig mit den entsprechenden Säuren vergleichbar, sie sind dabei weniger toxisch als andere Säurederivate (Ester, Nitrile) oder die analogen Hydroxylverbindungen. Während das paarweise Auftreten von Amid und Säure in biologischen Systemen wohlbekannt ist - Asparagin/Asparaginsäure, Glutamin/Glutaminsäure, Lipoamid/Liponsäure und Nicotinamid/Nicotinsäure mögen als Beispiele dienen -, gibt es in der Pharmakologie nur wenige Beispiele für den alternativen Einsatz solcher Paare. Ein Grund mag die trotz der Interkonversibilität gut dokumentierte Unterschiedlichkeit im (Neben-)Wirkungsspektrum sein (Tab.3).

Bemerkenswerter Weise gibt es trotz intensiver Suche nach wasserlöslichen Analoga von BAL bislang keine Berichte über die biologische Wirksamkeit von vicinalen Dithiolen vom Amid-Typ. Die Problematik dieser Substanzgruppe liegt möglicherweise in ihrer chemischen Darstellung begründet; denn entgegen der Vielzahl gut zugänglicher Hydroxy-, Carboxylat- und Sulfonatverbindungen mit vicinaler Dithiolgruppe fehlen bislang systematische Untersuchungen über die Darstellbarkeit von vic-Dimercaptoamiden.

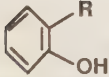
Pavlic u. Mitarbeiter berichteten über Versuche zur Darstellung von 2,3-Dimercaptopropylharnstoff und 2,3-Dimercaptopropylurethan (PAVLIC 1949). Letzteres (keine freie Amidgruppe!) konnte zwar als sirupöse Masse nach Vakuumdestillation mit befriedigender Element-

analyse im Labormaßstab erhalten werden, bei ersterem konnte jedoch nur ausnahmsweise eine 94%ige Reinheit (bezogen auf SH-Gehalt) erzielt werden. Ferner erwähnen dieselben Autoren mißlungene Versuche der Synthese des analogen N-Acetamids. Auch fehlen Angaben über eine eventuelle biologische Wirksamkeit der dargestellten Verbindungen.

In der russischen Literatur wurde die erfolgreiche Darstellung von 2,3-Dimercaptopropansulfonamid und verwandter N-substituierter Substanzen behauptet, ohne jedoch bisher von anderen Autoren bestätigt worden zu sein (PETRUNKIN 1959) (vgl. Abschn. 5.2).

Andere untersuchte Verbindungen enthielten Amidfunktionen, wobei jedoch die Dithiolgruppierung durch Schutzgruppen (Thioether) blockiert waren. Auch in diesen Fällen war die Identität unzureichend dokumentiert, und für eine Substanz wurde angegeben, daß sie der Wirksamkeit von BAL bei der cutanen Detoxifizierung von Lewisit unterlegen war (BARRON 1947b; THOMSON 1947).

	R = COOH Nicotinsäure	R = CONH ₂ Nicotinamid	R = COOC ₂ H ₅ Nicotinsäure- ethylester
Pellagra-Prävention	+	+	+
periph. Vasodilatation	+	-	+
Uterusrelaxation	-	+	-
LD 50 (mmol/kg)	34 Na-Salz (Ratte s.c.)	14 (Ratte s.c.)	

	R = COOH Salicylsäure	R = CONH ₂ Salicylamid	R = COOC ₂ H ₅ Salicylsäure ethylester
antipyret. Wirkung	+	±	+
partielle Thrombo- plastinzeit (Quick)	↑	↓	↑
Hörschäden u. Erbrechen (bei Überdosierung)	+	-	?
LD 50 (mmol/kg)	6.9 - 10.0 Na-Salz (Kaninchen p.o.)	22.0 (Kaninchen p.o.)	8.4 (Meersch. p.o.)

	R = -OH p-Amino- benzoesäure	-NH(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ Procainamid	-O(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ Procain
anästhetische Wirkung	-	-	+
hypotensive Wirkung	-	+	+
antiarrhythmische W.	±	+	±
LD 50 (mmol/kg)	33 Na-Salz (Maus i.v.)		0.24 (Maus i.v.)

Tab. 3: ausgewählte Unterschiede im Wirkungsspektrum strukturverwandter Verbindungen

- = geringe Wirkung += deutliche Wirkung
↓ = Verkürzung ↑ = Verlängerung

Literatur: Sollmann 1957; LD 50-Werte nach Sollmann 1957, Spector 1956

4. Problemstellung

Die voranstehenden Ausführungen machen deutlich, daß heute zur Behandlung der akuten Arsenvergiftung zwar einige wirksame Antidote entweder bereits zur Verfügung stehen oder in der Prüfung sind, daß es aber für viele Probleme, die bei ihrer Anwendung auftauchen, bislang keine befriedigenden Lösungen gibt.

Drei Fragenkomplexe werden in der vorliegenden Arbeit näher behandelt:

- 1) Kann die Lücke, die zwischen gut wasserlöslichen, gut verträglichen Substanzen von mäßiger Wirksamkeit und gut lipidlöslichen, aber weniger verträglichen Substanzen von hoher Wirksamkeit klafft, durch chemische Strukturvariationen weiter verringert werden?
- 2) Ist die Inaktivierung von Antidoten mit vic-Dithiol-Gruppe durch Disulfidbildung in biologischen Systemen reversibel?
- 3) Kann zur Abschätzung von Bindungsstabilitäten verschiedener Metall-Antidot-Komplexe ein Reaktionsmodell gefunden werden, das die kinetische Kontrolle der untersuchten Spezies besser berücksichtigt?

Die im ersten Punkt angesprochene Polarisierung, die am besten durch die Antidote DMPS einerseits und BAL andererseits charakterisiert ist, hat möglicherweise für die Optimierung der Therapiestandards bei akuter und subakuter Arsenvergiftung große Bedeutung. Es ist von anderen Autoren bezweifelt worden, ob die wasserlöslichen Antidote überhaupt Lipidbarrieren in nennenswertem Ausmaß überwinden können und intrazellulär wirken (APOSHIAN 1986). (Denkbar wäre auch eine Gleichgewichtsverlagerung aus der Zelle in den extrazellulären

Raum durch effiziente Inaktivierung und Elimination von "zirkulierendem" Arsen.) Die Verfügbarkeit einer lipidgängigen, wenig toxischen Substanz könnte besonders in der ersten Therapiephase einen deutlichen Vorteil gegenüber der eingeschränkten Verträglichkeit von BAL darstellen (höhere Dosierbarkeit!). In diesem Sinne sollte eine vic-Dithioverbindung mit Amidgruppierung eine gewisse Verbesserung in Aussicht stellen. Über die Versuche zur chemischen Darstellung derartiger Substanzen wird in den Abschnitten 5.1 und 5.2 berichtet. Auf die Eignung der dargestellten Substanzen im Vergleich zu bekannten Antidoten wird in den Abschnitten 6. und 7. näher eingegangen.

Das Problem der Inaktivierung von Thiolen durch Oxidation ist lange bekannt und einer der limitierenden Faktoren bei der Synthese, Lagerung und Anwendung von SH-Verbindungen. In Gegenwart von Metallkationen und (Luft-)Sauerstoff läuft diese Reaktion beschleunigt ab, so daß dadurch die Verfügbarkeit freier Dithiole offenbar ebenso herabgesetzt werden kann, wie dies durch Wechselwirkung mit körpereigenen Redoxsystemen zu erwarten ist (BARRON 1947a). Während im ersten Falle vor allem dimere und polymere, zyklische und offenkettige Oxidationsprodukte gleichartiger Bauweise auftreten, ist im zweiten Fall auch die Bildung gemischter Disulfide zu erwarten. Ormstad und Mitarbeiter konnten vor einiger Zeit am System 2-Mercaptoethansulfonat (MESNa)/ DiMESNa zeigen, daß Disulfide möglicherweise durch zelluläre Reduktionsvorgänge wieder in das aktive Thiol überführt werden können (ORMSTAD 1983). Die mögliche Übertragung dieser Befunde auf DMPS, das sich durch eine zusätzliche Mercaptomethylengruppe von MESNa unterscheidet, wird in den Abschnitten 5.3, 5.4.2 und 6.1 untersucht.

Schließlich finden sich im Abschnitt 5.4.1 die Ergebnisse von Experimenten, die zur Abschätzung von Komplexstabilitäten verschiedener

Metall-Antidot-Verbindungen aufgrund eines reaktionskinetischen Modells durchgeführt wurden.

C Ergebnisse

5. Chemische Synthesen und Analytik

a) Allgemeine Vorbemerkungen

Die chemische Darstellung von Dithiolen wurde nach der Einführung von BAL insbesondere von britischen, amerikanischen und russischen Chemikern in den 40er und 50er Jahren intensiv untersucht. Die wesentlichen Aspekte dieser Chemie hat Owen in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt (OWEN 1961). Andere Monografien über die Chemie der SH-Gruppe sind ebenfalls verfügbar (JOCELYN 1972; PATAI 1974).

Während für die Synthese simpler Dithiole eine ganze Reihe brauchbarer Methoden zur Verfügung steht, führen in Anwesenheit anderer funktioneller Gruppen meist nur noch wenige Wege zum Ziel. Ursache ist fast immer die große Reaktivität des Thiol-Schwefels, die infolge vielfacher Nebenreaktionen den Zugang zum gewünschten Produkt erschwert oder gar unmöglich macht.

Die klassischen Darstellungsmethoden aliphatischer Dithiole gehören in der Mehrzahl zur Gruppe der S_N1 - und S_N2 -Reaktionen. Ausgangsmaterial ist üblicherweise das Dibromoderivat, da Bromid eine gute Abgangsgruppe ist, die durch den nukleophilen Schwefel auch in sekundären Positionen in brauchbaren Ausbeuten ersetzt wird. Wo das Dibromid nicht verfügbar ist, gelingt häufig die Derivatisierung des Dihydroxyprodukts mit leicht spaltbaren Sulfochloriden. Gute Resultate sind auch bei reduktiver Spaltung von zyklischen Trithiocarbonaten erhalten worden (IQBAL 1960).

b) **Vorbemerkungen zur Synthese von vic-Dimercapto- amiden**

Bei der Synthese vic-Dithiole mit Amidfunktion liegt die zusätzliche Schwierigkeit in der Labilität der Amidgruppe. Aliphatische Carbon- und Sulfonamide sind instabiler als ihre Arylanaloga und werden in stark alkalischer oder saurer Lösung bereits in der Kälte hydrolysiert (DUGUET 1902).

Die im folgenden beschriebenen Syntheseveruche konzentrierten sich auf die Darstellung von zwei verschiedenen vic-Dithiolen vom Amid-Typ:

- 1) 2,3-Dimercaptopropionamid
- 2) 2,3-Dimercaptopropansulfonamid

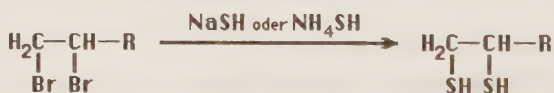
Beide Substanzen sind in der chemischen Literatur bislang nicht dokumentiert. Die Existenz von (2) wurde lediglich in einer russischen Arbeit behauptet, ohne daß dabei eine Vorschrift zur Darstellung oder analytische Daten, die die Identifizierung erlauben, mitgeteilt wurden (PETRUNKIN 1959). Hinweise zur Darstellung des Na-Salzes der korrespondierenden Sulfonsäure in derselben Arbeit lieferten dabei den Ausgangspunkt der methodischen Überlegungen. Das Na-Salz wurde auch von britischen Forschern in reiner Form dargestellt (JOHARY 1955c) und ist in der BRD als Dimaval® (Fa. Heyl, Berlin) im Handel. Auch (1) ist bislang offenbar nicht dargestellt worden (CAS-Lit.Recherche bis Dez. 86), obwohl die korrespondierende Säure lange bekannt ist (PAVLIC 1946).

Bei der Wahl, welche der funktionellen Gruppen zweckmäßig zuerst eingeführt wird, wurde der Amidgruppe der Vorzug gegeben, da hier-

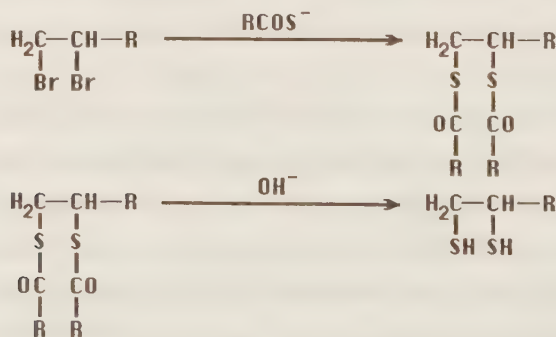
bei drastischere Reaktionsbedingungen erforderlich sind als bei den Thiolgruppen. Ausgangsprodukt war in beiden Fällen das Dibromoderivat. Sowohl 2,3-Dibromopropionamid als auch 2,3-Dibromopropansulfonamid sind in der Literatur beschrieben (MOUREU 1894; BELOUS 1950). Bei letzterem war nur ein Abstract der russischen Arbeit verfügbar, so daß die Synthese des Ausgangsproduktes neu ausgearbeitet werden mußte.

Für die Einführung der SH-Gruppen wurden drei verschiedene Wege untersucht:

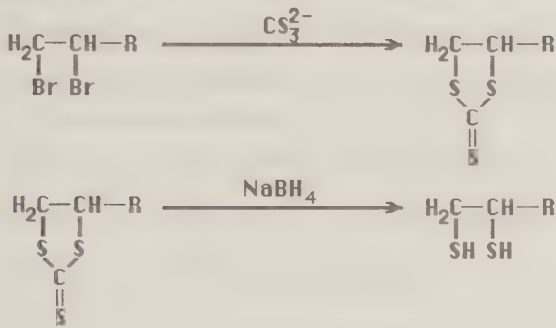
A) direkt: Sulfhydrierung mit NaSH bzw. NH_4SH



B) indirekt: Verseifung der Bis(acyl)thioester



C) indirekt: reduktive Spaltung der Trithiocarbonate



Anderen Methoden war aufgrund der Labilität der Amidgruppe von vornherein wenig Aussicht auf Erfolg beschieden worden.

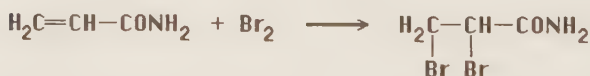
5.1 2,3-Dimercaptopropionamid (DMPA)

Für das bislang unbekannte 2,3-Dimercaptopropionamid sollte vom Dibromoderivat ausgegangen werden. Da dies kommerziell nicht erhältlich war, wurde als erste Stufe das Dibromoderivat aus Acrylamid hergestellt. Das Dibromoderivat ist in der Literatur beschrieben (MOUREU 1894).

Der indirekte Weg über Methode B (vgl. Abschn. 5) erforderte als weitere Vorstufe die Synthese des bislang nicht berichteten Bis(acetyl)-thioesters. Für die Darstellung der Dimercaptoverbindung nach Methode C war das ebenfalls unbekannte 1,3-Dithiolan-2-thion-4-carbamid zu synthetisieren.

5.1.1 Darstellung von 2,3-Dibromopropionamid

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

13.2 g frisch umkristallisiertes Acrylamid (= 0.186 mol) wurden in 250 ml Chloroform (+ 1% Ethanol) gelöst und zum Sieden erhitzt. Dazu wurden unter Rückfluß 30 g Brom, gelöst in 100 ml Chloroform, bei Vermeidung eines Bromüberschusses zugetropft. Danach wurde noch 1 h weitergerührt, abgekühlt und über Nacht zur vollständigen Fällung bei

4 °C stehengelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem n-Hexan gewaschen und über CaCl_2 vakuumgetrocknet.

Ausbeute: (roh) 39.8 g (= 93 % d.Th.)

Smp.: 127 - 129 °C

39.0 g Rohprodukt wurden in Wasser/Methanol (3+1) gelöst, mit Aktivkohle geklärt, bis zur beginnenden Ausfällung eingengt und aus Wasser/Methanol umkristallisiert und bei 4 °C stehengelassen. Die farblosen Kristalle wurden abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und über CaCl_2 und P_2O_5 im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 37.0 g $\text{C}_3\text{H}_5\text{NOBr}_2$

fbl. Schuppen, Smp.: 129 - 130 °C (Lit. 130 - 133 °C)

Elementanalyse: $\text{C}_3\text{H}_5\text{NOBr}_2$ FG = 230.89

	C	H	N	Br	
Ber.:	15.61	2.18	6.07	69.21	%
Gef.:	15.56	2.16	6.14	69.20	%

5.1.2 Untersuchungen zur Darstellung von DMPA

a) Versuch der direkten Darstellung (Methode A)

0.76 g Natriummetall (= 0.032 mol) wurden in 60 ml abs. iso-Propanol gelöst. Dann wurde trockenes H_2S -Gas bis zur Sättigung ein-

geleitet und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. In die eiskalte Lösung wurden im trockenen N₂-Gegenstrom portionsweise 4.2 g (= 0.015 mol) Dibromoderivat eingetragen. Nach Beendigung der Zugabe wurde in der Kälte weitergerührt, wobei sich die Lösung langsam trübte. Schließlich wurde vorsichtig auf Raumtemperatur erwärmt, und zur vollständigen Fällung des Bromids über Nacht stehengelassen. Nicht umgesetztes Hydrogensulfid wurde im trockenen CO₂-Strom ausgeblasen, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat 72 h gefriergetrocknet. Zurück blieb eine farblose, klebrige Masse (ca. 1.3 g), ll. in Alkohol, Aceton u. Ether. Obwohl die SH-Nachweisreaktionen mit Nitroprussidnatrium und DTNB positiv waren, ergaben Versuche zur Adduktbildung mit Pb-acetat und Hg(CN)₂ keinen Hinweis auf die Anwesenheit von Thiolgruppen (lediglich schwarze Sulfidfällungen wurden beobachtet), so daß das Produkt nicht weiter aufgearbeitet wurde.

b) Versuch der Darstellung des Bis(acetyl)thioesters (Methode B)

In 120 ml wasserfreiem Ethanol wurden 4.62 g (= 0.02 mol) trockenes Dibromopropionamid gelöst. Zur klaren Lösung wurden dann bei RT 5.2 g (= 0.045 mol) fein gepulvertes Kaliumthioacetat gegeben und kräftig im trockenen N₂-Strom gerührt. Nach 2 h hatte sich die Lösung unter deutlicher H₂S-Entwicklung blutrot gefärbt. Es wurde noch 24 h weitergerührt, bei 4 °C stehen gelassen und abfiltriert. Auf dem Filter blieb ein braunroter, pulveriger Rückstand. Das dunkle Filtrat hinterließ nach der Gefrier Trocknung eine schwarze, teerartige Masse, die nicht weiter aufgearbeitet wurde.

c) Versuch der Darstellung des Trithiocarbonats (Methode C)

In 2.5 g (= 0.045 mol) festem Kaliumhydroxid in 100 ml Methanol wurde bis zur Sättigung H_2S -Gas eingeleitet. Dann wurden 1.8 ml ($\approx$ 0.022 mol) Schwefelkohlenstoff und 4.62 g (= 0.02 mol) Dibromopropionamid zugegeben, wobei sofort eine intensive Rotfärbung auftrat. Danach wurde noch 1 h weitergerührt und über Nacht stehengelassen. Bei der anschließenden Neutralisation mit NH_4Cl verblaßte die Farbe zusehends und es entwickelte sich H_2S -Gas. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingeeengt, der Rückstand (blaßgelb) in THF aufgenommen, erneut von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert und eingeeengt. Bei der anschließenden Trocknung im Exsikkator entwickelte sich weiter H_2S , zurück blieb eine farblose, klebrige Masse, die keinerlei Anhaltspunkte mehr für eine Dithiolanthion-Struktur mehr bot und daher nicht weiter aufgearbeitet wurde.

d) Schlußbemerkung

Auf keine Weise konnte im Rahmen dieser Untersuchungen die Existenz des bislang unbekannten α,β -Dimercaptopropionamids nachgewiesen werden. Die Testung der erhaltenen Rohprodukte in der in-vitro Wirksamkeitsprüfung (zur Methode vgl. Abschn. 6.1) ergab keinen Anhaltspunkt für eine Antidotwirkung.

5.2 2,3-Dimercaptopropansulfonamid (DMPSA)

Auf einem medizinischen Kongreß in Kiev stellte Petrunkin 1957 eine Reihe neuer Dithiolverbindungen vor, die er mit seinen Mitarbeitern durch direkte Umsetzung der Dibromoderivate mit Natriumhydrogensulfid erhalten hatte. Es wurde berichtet, daß V.A. Portnjaginoi mit dieser Methode auch Sulfamide dargestellt habe. Im Kongreßbericht, in dem analytische Daten der reklamierten Substanzen nur sehr spärlich angegeben wurden, sind jedoch solche Angaben für das Sulfamid vollkommen ausgespart worden (PETRUNKIN 1959), und eine andere Originalarbeit des Verfassers ist über Chemical Abstracts nicht nachweisbar. Da diese Substanzen in der Literatur seitdem nicht mehr erwähnt sind oder gar reproduziert wurden, muß davon ausgegangen werden, daß die Existenz der Verbindung zweifelhaft ist. Dennoch wurde der von Petrunkin vorgeschlagene Syntheseweg den ersten Experimenten zugrundegelegt.

Da das Dibromoderivat und weitere Vorstufen kommerziell nicht verfügbar waren, mußte dieses zunächst dargestellt werden. Obwohl auch dafür in der westlichen Literatur keine Vorschrift existierte, hatten Owen u. Mitarbeiter bei der Synthese des 2,3-Dimercaptopropansulfonats offenbar mit gutem Erfolg Teile einer Vorschrift von Belous und Postovskii nachgearbeitet (JOHARY 1955d), die als Abstract aus dem Russischen zugänglich war (BELOUS 1950). Dieses Abstract diente bei den Synthesen der notwendigen Vorstufen (Abschn. 5.2.1. - 5.2.4) als Vorlage, mit deren Hilfe die einzelnen Schritte neu ausgearbeitet wurden.

Ausgangsstoff war Allylbromid, das im ersten Schritt in Allylsulfonat umgewandelt wurde (Abb. 7A). Dieses wurde ohne Isolierung mit

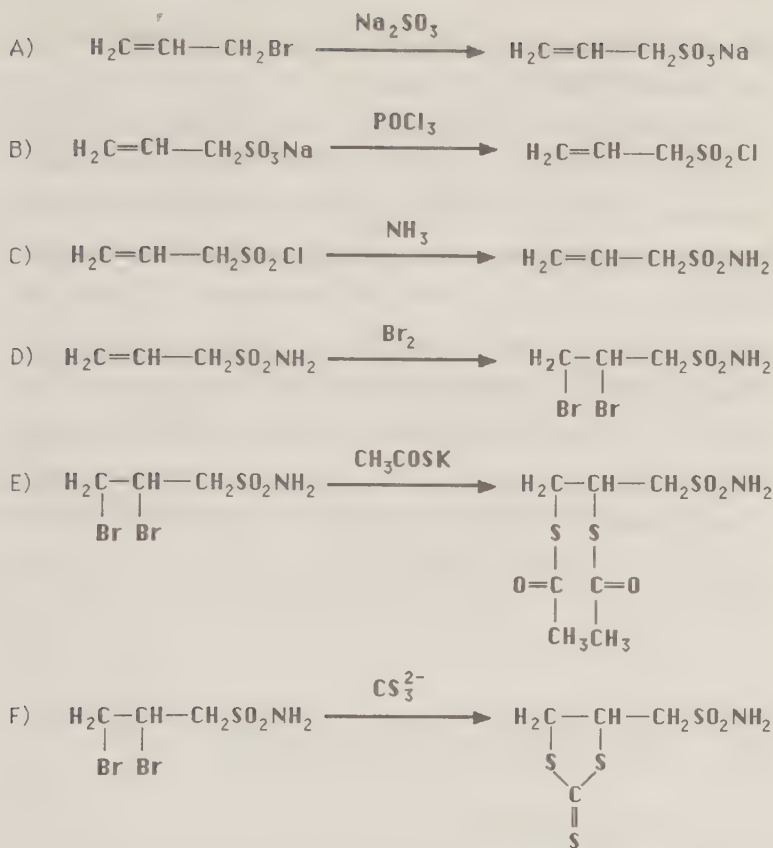


Abb. 7: Vorstufen zur Darstellung von 2,3-Dimercaptopropansulfamid
(Erläuterungen im Text)

Phosphoroxotrichlorid zum Allylsulfochlorid umgesetzt, da das mitentstandene Natriumbromid bei dieser Reaktion nicht störte (Abb. 7B). Aus dem Sulfochlorid konnte durch Umsetzung mit Ammoniak das Allylsulfonamid in guter Ausbeute erhalten werden (Abb. 7C), welches

nach der Addition von Brom das gewünschte 2,3-Dibromopropan sulfonamid ergab (Abb. 7D).

Die Darstellung des Dimercaptoamids wurde wiederum auf drei verschiedenen Wegen versucht. Neben der direkten Umsetzung der Bromverbindung mit NaSH bzw. NH_4SH (vgl. Abschn. 5, Methode A) war dazu die Darstellung des bislang unbekannten Bis(acetyl)thioesters (Methode B) und des ebenfalls bisher nicht beschriebenen 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfamids (Methode C) erforderlich. Ersteres sollte durch Umsetzung des Dibromoamids mit Kaliumthioacetat zugänglich sein (Abb. 7E), letzteres bei der Reaktion mit Trithiocarbonaten entstehen (Abb. 7F).

Die im folgenden genannten Literaturwerte beziehen sich auf * BELOUS 1950 und ** JOHARY 1955d.

5.2.1 Darstellung von Allylsulfonat-Natrium

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

138.6 g (= 1.1 mol) Natriumsulfit wurden in 600 ml Wasser gelöst und auf ca. 60 °C vorgewärmt. Zur klaren Lösung wurden unter Rühren 147.0 g (= 1.2 mol) frisch destilliertes Allylbromid langsam zuge tropft, so daß die Innentemperatur 65 °C nicht überschritt. Am Ende der Zugabe wurde noch 3 h weitergerührt, abgekühlt und die ölige Lö-

sung mit Aktivkohle entfärbt und filtriert. Das farblose Filtrat wurde auf die Hälfte seines Volumens eingengt und gefriergetrocknet. Der farblose Rückstand wurde schließlich über P_2O_5 nachgetrocknet.

Ausbeute: 269.0 g $C_3H_5O_2SNa \cdot NaBr$ (= 99.7 % d. Th.)

Smp.: 233 °C (Zers.)

(Lit.: ca. 235 °C *)

Das 1H -NMR-Spektrum des Doppelsalzes zeigt Abb. 8. Bei 2.5 ppm erscheint der Lösungsmittel-Peak (d_6 -DMSO), bei 3.5 ppm als Singulett das Kristallwasser. Die Protonen von C1 geben das Dublett bei 2.2 ppm, das breite Dublett bei 5.1 ppm gehört zu den C3-Protonen. Das ψ -Quintett bei 6.2-5.5 ppm stammt vom Methin-Proton an C2.

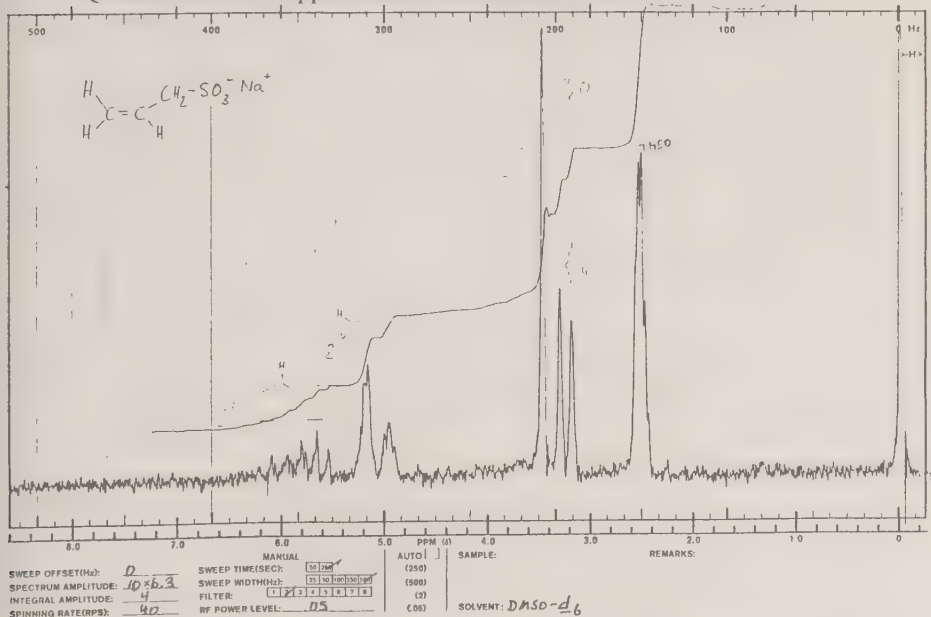
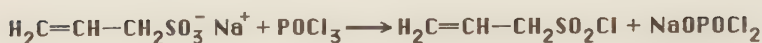


Abb. 8: 60 MHz - 1H - NMR - Spektrum von Allylsulfonat

5.2.2 Darstellung von Allylsulfochlorid

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

217.3 g ($\approx$ 0.8 mol) trockenes Allylsulfonat/Bromid-Doppelsalz wurden portionsweise unter N_2 -Atmosphäre zu 300 ml frisch destilliertem POCl_3 gegeben. Nach der Zugabe wurde noch 2 h unter heftigem Rühren am Rückfluß gekocht, dann stehengelassen. Nach dem Abkühlen wurde der vorhandene Niederschlag unter N_2 abgesaugt und der Filterrückstand zweimal mit POCl_3 gewaschen. Das gelbliche Filtrat wurde am Wasserstrahlvakuum eingeeengt, bis kein POCl_3 mehr überging. Der ölige Rückstand wurde anschließend einer Hochvakuumdestillation über eine 20 cm Vigreux-Kolonnen unterworfen. Die Hauptfraktion bildete eine farblose, ölige Flüssigkeit von stechendem, knoblauchartigem Geruch.

Ausbeute: 75.3 g $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{SCl}$ (= 67 % d.Th.)

Sdp. 50 - 52 °C / 6 mbar (Lit. 74 - 76 °C / 15 mm Hg**
bzw. 74 °C / 12-13 mm Hg*)

$$n_D^{20} = 1.4760 \quad \text{.. (Lit. } n_D^{20} = 1.4767^{**} \\ n_D^{14} = 1.4730^*)$$

5.2.3 Darstellung von Allylsulfonamid

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

22.8 g (= 0.16 mol) frisch destilliertes Allylsulfochlorid wurden unter N₂-Atmosphäre in 150 ml trockenem Diethylether auf -50 °C abgekühlt (CO₂/Methanol). Dann wurde trockenes NH₃-Gas kondensiert und unter heftigem Rühren zur kalten Lösung zugetropft. Gegen Ende der Reaktion wurde langsam aufgewärmt und, nachdem weiteres Zutropfen von NH₃ ohne Niederschlagsbildung verlief, die Kondensation abgebrochen. Überschüssiges NH₃ wurde im N₂-Strom ausgeblasen, ausgefallenes NH₄Cl abfiltriert und mehrmals mit trockenem Ether gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit Aktivkohle entfärbt und zur Trockne eingengt. Der farblose Rückstand ergab nach Umkristallisation aus CHCl₃/EtOH (95+5) beim Stehen in der Kälte einen kristallinen Niederschlag, der abgesaugt, mit kaltem n-Hexan gewaschen und über CaCl₂ getrocknet wurde.

Ausbeute: 17.8 g C₃H₇NO₂S (= 91 % d.Th.)

fbl. Prismen, Smp. 44 °C (Lit. 43 °C*)

Elementanalyse: C₃H₇NO₂S FG = 121.16

	C	H	N	S
Ber.:	29.74	5.82	11.56	26.46 %
Gef.:	29.69	5.70	11.69	26.31 %

Das ^1H -NMR-Spektrum der Substanz ist in Abb. 9 gezeigt. Man findet das Signal der Amid-Protonen bei 5.2 ppm. Das Dublett bei 4.1 ppm stammt von den Protonen an C1. Die Signale der Vinyl-Protonen zwischen 5.4 und 6.3 ppm überlagern sich.

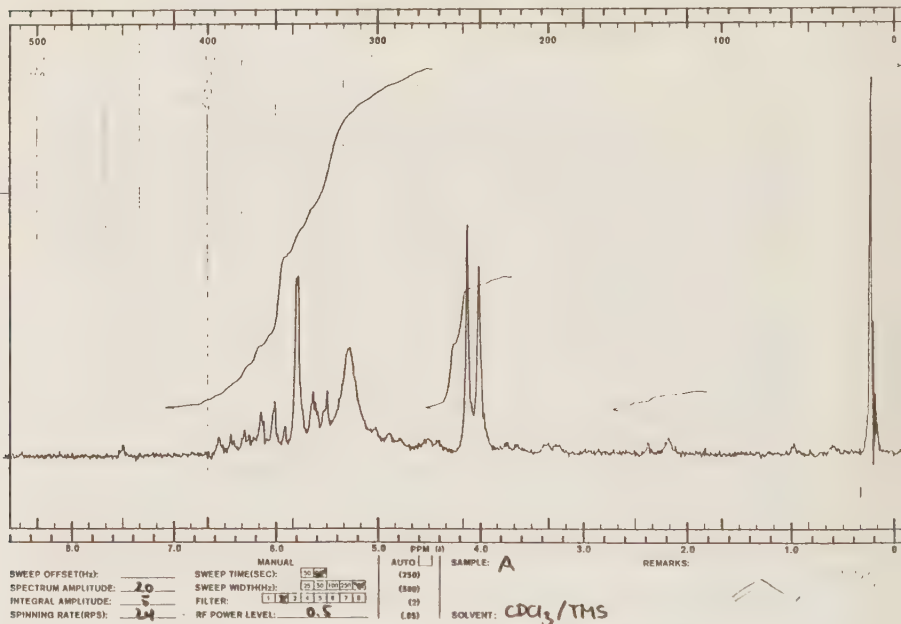
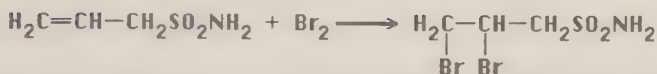


Abb. 9: 60 MHz - ^1H - NMR - Spektrum von Allylsulfonamid

5.2.4. Darstellung von 2,3-Dibromopropansulfonamid

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

Zu 12.1 g (=0.1 mol) Allylsulfonamid in 150 ml $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (9+1) wurden unter Rückfluß langsam 17.5 g Brom, gelöst in 50 ml CHCl_3 , unter Vermeidung von überschüssigem Brom zugetropft. Nachdem sich die Lösung nicht mehr entfärbte, wurde noch 6 h weitergerührt und über Nacht bei 4 °C stengelassen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit wenig kaltem CHCl_3 gewaschen. Mutterlauge und Waschlösung wurden gemeinsam eingeengt und erneut abgesaugt. Die vereinigten Filtrerrückstände wurden getrocknet, in 200 ml Methanol aufgenommen und über Aktivkohle geklärt und filtriert. Das farblose Filtrat wurde auf die Hälfte seines Volumens konzentriert und bei Raumtemperatur mit der doppelten Menge Wasser versetzt, die zur einsetzenden Fällung nötig war. Unter mildem Erwärmen wurde erneut alles gelöst und zur Kristallisation in der Kälte aufbewahrt. Dann wurden die glänzenden, farblosen Kristalle abgesaugt, zweimal mit wenig kaltem Wasser gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 23.6 g $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{SBr}_2$ (= 84 % d.Th.)
 fbl. Prismen, Smp.: 98 °C (Lit. 95-96 °C*)

Elementanalyse: $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{SBr}_2$ FG = 280.97

	C	H	N	S	Br
Ber.:	12.82	2.51	4.99	11.41	56.88 %
Gef.:	12.90	2.57	5.02	11.46	56.94 %

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt Abb. 10. Man findet das Signal der $-\text{NH}_2$ -Protonen bei 4.9 ppm. Die übrigen Protonensignale im Bereich von 3.6 bis 4.4 ppm werden nicht getrennt aufgelöst.

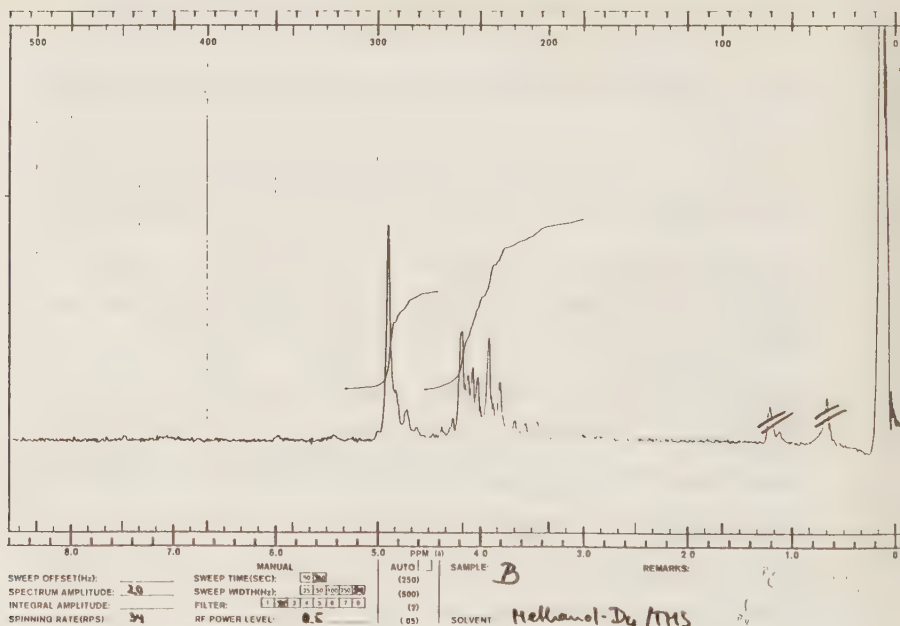


Abb.10: 60 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 2,3-Dibromopropansulfonamid

5.2.5 Darstellung von 2,3-Bis(acetylthio)propansulfonamid (BAPSA)

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

Da das kommerziell verfügbare Kaliumthioacetat entgegen den Herstellerangaben erheblich verunreinigt war, wurde es vor Gebrauch aus Ethanol/ CHCl_3 (4+1) umkristallisiert und über P_2O_5 getrocknet.

5.62 g (= 0.02 mol) Dibromosulfamid wurden in 80 ml trockenem Ethanol gelöst und unter N_2 -Atmosphäre auf 50 °C erwärmt. Unter Rühren wurden zur warmen Lösung 5.5 g (= 0.048 mol) frisch umkristallisiertes Kaliumthioacetat, gelöst in 100 ml trockenem Ethanol, zuge tropft. Nach Einsetzen der Salz fällung wurde noch 3 h auf dem Wasserbad weitergerührt und bei 4 °C stengelassen. Dann wurde das blaßgelbe Reaktionsgemisch abgesaugt, zur Trockne eingengt, in ca. 40 ml Methylenchlorid aufgenommen und erneut abgesaugt. Das Filtrat konnte durch Aktivkohle nicht entfärbt werden und wurde daher vom Lösungsmittel befreit und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 5.0 g Rohprodukt (= 92 % d.Th.)
blaßgelber, viskoser Sirup

Die DC-Analyse (Kieselgel 60, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 4+1, Jodkammer) zeigte neben dem Hauptprodukt noch mindestens 5 Verunreinigungen an. Zur Reinigung wurde daher 1.0 g Rohprodukt in CHCl_3 gelöst und an Kieselgel 60 chromatografiert (Säule $d=30$ mm, $h=200$ mm; Eluent: 1) CHCl_3 , 2) $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (4+1), 3) EtOH). In reinem Chloroform wanderte eine Fraktion, die nicht das gewünschte Produkt enthielt. Dieses wurde jedoch mit der Front des $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ -Gemischs ausgewaschen, ein Rückstand konnte dann mit reinem EtOH eluiert werden.

In der Hauptfraktion verblieben nach Entfernung des Lösungsmittels noch 0.8 g einer blaßgelben Masse, die unter keinen Umständen zur Kristallisation gebracht werden konnte. Erneute DC-Analyse zeigte noch mindestens eine Verunreinigung, die unmittelbar vor der Hauptfraktion wanderte.

Elementanalyse: $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}_3$ FG = 271.38

	C	H	N	S
Ber.:	30.98	4.83	5.16	35.45 %
Gef.:	32.95	5.01	5.77	31.09 %

Das ^1H -NMR-Spektrum der Substanz zeigt Abb.11. Man erkennt das breite Signal der NH_2 -Protonen bei 5.4 ppm. Die Singulets der Acetyl-Gruppen liegen bei 2.4 ppm (S-acetyl) bzw. 2.2 ppm (O-acetyl), werden aber für C2 und C3 vermutlich nicht aufgelöst. Aus dem Verhältnis beider Integrale ergibt sich ein Gehalt von ≈ 60 % Bis(acetylthio)ester. Die Protonen von C1, C2 und C3 erscheinen ebenfalls überlagert.

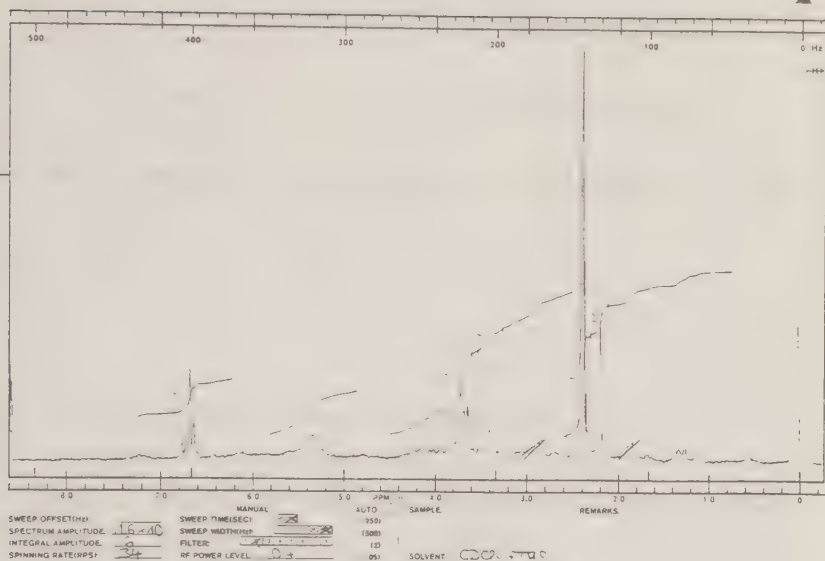
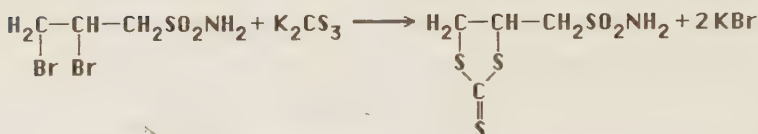


Abb.11: 60 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 2,3-Bis(acetylthio)propan-sulfonamid

Das Produkt wurde noch nicht weiter gereinigt. Es war ll. in Alkohol, Aceton und Chloroform; l. in DMSO; wl. in Wasser, Ether, Ethylacetat und Benzol. Die Löslichkeit in Wasser nahm in der Wärme beträchtlich zu, gleichzeitig setzte offenbar oberhalb von 60 °C bereits die Hydrolyse des Thioesters ein, erkennbar am auftretenden, an BAL erinnernden Geruch. In kaltem Wasser zeigte die Substanz keine Reaktion auf freie SH-Gruppen, aber in der Wärme bildete sich mit Pb-Acetat ein intensiv gelber, mit $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ein farbloser Niederschlag, bei Zugabe von Ellman's Reagenz eine intensive Gelbfärbung.

5.2.6 Darstellung von 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonamid (DTMSA)

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

Zu 2.5 g (= 0.045 mol) festem Kaliumhydroxid in 100 ml wurde bis zur Sättigung H_2S -Gas eingeleitet. Nach Zugabe von 1.8 ml (0.03 mol) CS_2 wurden zur gelben Lösung langsam 5.62 g (= 0.02 mol) Dibromosulfamid, gelöst in 20 ml Methanol zugetropft und die Reaktionsmischung langsam auf dem Wasserbad zum Sieden gebracht. Bei einsetzender Trübung wurde die Heizung ausgeschaltet und noch 5 h weitergerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch abgesaugt, der Rückstand mit Ethanol gewaschen und das Filtrat mit der Waschlösung vereinigt und zur Trockne eingengt. Das trockene Rohprodukt wurde in wasserfreiem THF aufgenommen, über Aktivkohle geklärt und von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Dann wurde das Lösungsmittel abgezogen und der zurückgebliebene, intensiv gelbe Feststoff über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 4.4 g Trithiocarbonat (= 96 % d.Th.)

4.0 g des gelben Feststoffs wurden aus Methanol/Wasser (1+2) umkristallisiert und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 3.9 g $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}_4$
gelbe Nadeln, Smp.: 152 °C

Elementanalyse: $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}_4$ FG = 229.36

	C	H	N	S
Ber.:	20.95	3.08	6.11	55.92 %
Gef.:	21.05	3.09	6.07	55.91 %

5.2.7 Untersuchungen zur Darstellung von 2,3-Dimercap-topropansulfonamid (DMPSA)

a) Versuch der direkten Darstellung (Methode A)

0.8 g (= 0.035 mol) Natriummetall wurden in 150 ml wasserfreiem Ethanol unter Schutzgas (N_2) gelöst und die klare Lösung mit trockenem H_2S -Gas gesättigt. Zu dieser Lösung wurden 4.21 g (= 0.015 mol) Dibromosulfamid in 25 ml trockenem Ethanol zugetropft. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad auf 60 °C erwärmt, nach dem Einsetzen der Trübung noch 2 h weitergerührt und abgekühlt. Ausgefallenes Salz wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in wasserfreiem THF aufgenommen, erneut von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 3.3 g Rohprodukt

fb., zerfließliche Masse, die beim Stehen H_2S entwickelte

Eine DC-Analyse (vgl. Abschn. 5.2.5) zeigte eine breite Spur von der Auftragstelle bis zur Front, in deren Verlauf zahlreiche Flecken erkennbar waren. Zugabe von Pb-Acetat zur methanolischen Lösung ergab eine gelbliche Trübung, aus der beim Stehen ein braunschwarzer Niederschlag ausfiel.

Das Ergebnis der Elementanalyse bestätigte den Verdacht der Zersetzung, so daß eine weitere Aufarbeitung unterblieb.

Elementanalyse:	$\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_3$ FG = 187.30			
	C	H	N	S
Ber.:	19.24	4.84	7.48	51.36 %
Gef.:	26.39	4.77	8.64	39.22 %

b) Verseifung des Bis(acetylthio)esters (Methode B)

Zu 2.7 g (≤ 0.01 mol) Bis(acetylthio)ester (vgl. Abschn. 5.2.5) in 50 ml wasserfreiem Ethanol wurden bei RT unter Schutzgas (N_2) 5 ml konz. NH_3 -Lösung (25 %) gegeben. Nach schonendem Erwärmen auf dem Wasserbad trübte sich die Lösung leicht und es entwickelte sich ein typischer Mercaptan-Geruch. Es wurde noch 1 h weitergerührt, dann abgekühlt und zur Trockne eingeeengt. Der verbliebene, opaleszente Rückstand wurde 48 h im Hochvakuum nachgetrocknet. Zurück blieb eine glasige Masse, deren DC-Analyse ein ähnliches Bild wie beim vorangegangenen Darstellungsversuch bot, jedoch mit Bleiacetat keine

Gelbfärbung hervorrief. Auch in diesem Falle wurde nach der Elementanalyse von einer weiteren Aufarbeitung Abstand genommen.

c) reduktive Spaltung des 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonamids (Methode C)

ca) Reduktion mit NaBH_4

0.54 g (= 2.4 mmol) DTMSA (vgl. Abschn. 5.2.6), in 5 ml MeOH gelöst, wurden in der Siedehitze zu einer Lösung von 80 mg NaBH_4 in 20 ml MeOH getropft. Nach 8 h Rückfluß war die Lösung immer noch gelb gefärbt, so daß die Reaktion abgebrochen wurde. Da die Gelbfärbung auch nach Neutralisation mit NH_4Cl bestehen blieb (intaktes Dithiolanthion-Gerüst!), wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

cb) Reduktion mit Zn/Essigsäure

Zu einer Suspension von 1.0 g (= 4.4 mmol) DTMSA und 1.0 g (= 15 mmol) Zn-Staub in 50 ml THF/Wasser (1+1), in die unter kräftigem Rühren N_2 -Gas eingeleitet wurde, wurde aus einer Bürette eine vorberechnete Menge 0.1 N Essigsäure tropfenweise zugegeben. Dabei verschwand die Gelbfärbung, und es entwickelte sich H_2S -Geruch. Nach der Zugabe wurde nicht umgesetztes Zn abfiltriert. In das schwach saure Filtrat wurde unter Schutzgasatmosphäre H_2S -Gas eingeleitet, worauf es zur Ausfällung eines feinen, gräulichen Niederschlags kam, der erst nach Adsorption an Aktivkohle durch Filtration entfernt werden konnte.

Das Filtrat wurde 48 h lang gefriergetrocknet und hinterließ ca. 0.7 g einer blaßgelben Masse, die jedoch in der DC-Analyse (vgl. Abschn. 5.2.5) eine Vielzahl von Flecken in einer langen Spur zeigte und daher nicht weiter aufgearbeitet wurde.

d) **Schlußbemerkung:**

Auf keine der oben angegebenen Verfahrensweisen konnte das gesuchte Amid des DMPS in freier Form erhalten werden. Die Möglichkeit der Darstellung wird zwar durch die geschilderten Versuche nicht bestritten, aber es ist gegenwärtig nicht ersichtlich, auf welchem Weg einmal größere Mengen dieser Verbindung erhalten werden könnten.

Die in-vitro Prüfung der erhaltenen Rohprodukte ergab keine wesentliche Aufhebung der durch Arsen verursachten Hemmung der Glucconeogenese (zur Methode vgl. Abschn. 6.1).

5.3 Oxidationsprodukte des 2,3-Dimercapto-propansulfonats (oxDMPS_x)

Oxidationsprodukte von Dithiolen sind immer wieder als Metaboliten in der Literatur genannt worden (AASETH 1983; APOSHIAN 1983), wobei sich jedoch alle Autoren auf eine einzige russische Arbeit zur Biotransformation von DMPS beziehen (LUGANSKII 1960). Darin wurden als wichtigste Metaboliten im Urin nach Gabe von ³⁵S-DMPS die Bis-Disulfide angesehen, fälschlicherweise Tetrasulfide genannt. Aposhian wies darauf hin, daß bei Disulfidbildung eine Vielzahl von Strukturen denkbar ist, die sich grob in zyklische Di- und Oligomere, sowie in offenkettige Polymere einteilen lassen. Die Vielzahl wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die beiden SH-Gruppen paarweise oder gekreuzt in S-S-Brücken überführt werden können, so daß bei Vorliegen eines racemischen Monomergemischs sechs verschiedene Dimere entstehen können (Abb. 12).

Eingehende Untersuchungen zu diesem Problembereich existieren bislang nicht. Eine russische Arbeit berichtet zwar über die erfolgreiche Synthese "des" DMPS-Disulfids, aber der Autor geht auf die damit verbundene Heterogenität nicht ein (LYSENKO 1974). Überdies stellen die angegebenen Analysedaten die Reinheit der Verbindung in Frage. Die Rolle der zyklischen Dimeren gewinnt im Lichte der Untersuchungen von Ormstad u. Mitarbeitern an Bedeutung, da diese am System MESNa / DiMESNa (MESNa = 2-Mercaptoethansulfonat, das sich vom DMPS durch Fehlen einer Mercaptomethylengruppe unterscheidet) zeigen konnten, daß DiMESNa in vivo, z.B. in Rattennieren, wieder zu aktivem Monomer reduziert werden kann (ORMSTAD 1983). Die Möglichkeit einer solchen Regeneration beim DMPS-Dimer ist unbekannt. Obwohl

eine Vielzahl von Methoden zur Darstellung von Disulfiden bekannt ist (vgl. dazu den Übersichtsartikel von FIELD 1977), gibt es

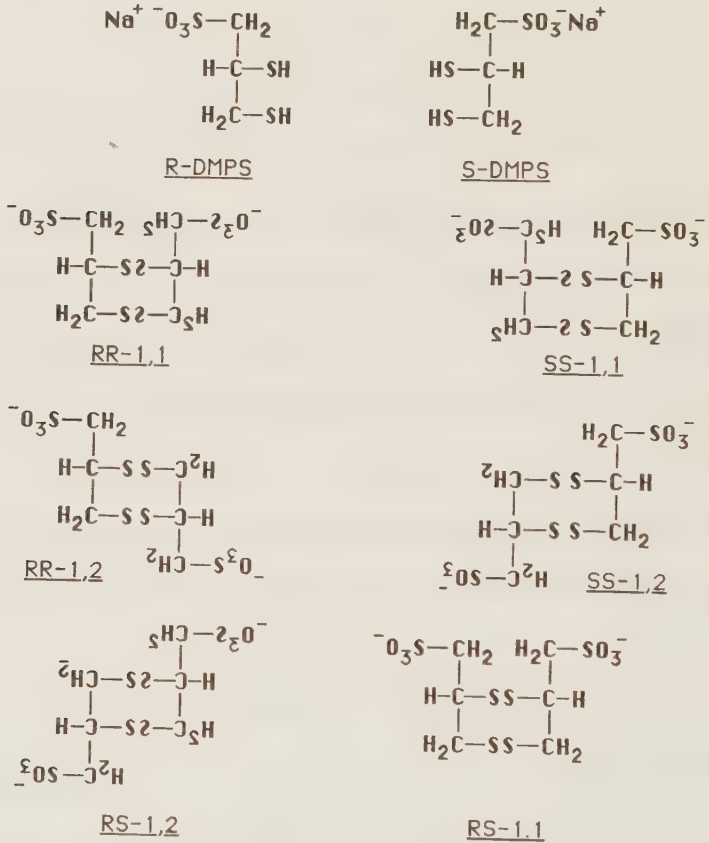


Abb. 12: Stereoisomerengemisch bei dimerer Bis(disulfid)-Bildung aus rac-DMPS (Spiegelschriftdarstellung)

keine selektiven Methoden zur gezielten Oxidation von Dithiolen. Ebenso wenig sind theoretische Untersuchungen bekannt, die Hinweise auf thermodynamische und kinetische Gesetzmäßigkeiten in solchen Systemen geben. Bekannt ist lediglich, daß die Neigung zur Disulfidbildung in der Reihe $\text{ArSH} > 1^\circ\text{AlkSH} > 2^\circ\text{AlkSH} > 3^\circ\text{AlkSH}$ abnimmt und daß bifunktionelle Systeme sich bei vergleichbaren Reaktivitäten annähernd statistisch verhalten (SCHÖBERL 1955).

Voruntersuchungen mit bekannten Verfahren zur Thioloxydation zeigten unmittelbar, daß bei der Oxidation von DMPS mit Jod, H_2O_2 , Cu^{2+} - und Fe^{3+} -Salzen oder Luftsauerstoff in Gegenwart katalytischer Metallverunreinigungen ein unübersehbares Gemisch von Oxidationsprodukten entstand, das teilweise nicht mehr reversibel reduziert werden konnte.

Die Suche nach selektiveren Methoden konzentrierte sich daher auf Vorschriften zur Darstellung von intramolekularen Disulfiden, bei denen eine ähnliche Problematik vorliegt. Eine Übersicht darüber findet sich bei VASILEVA 1976. Beim DMPS sollte die intramolekulare Disulfidbildung nicht möglich sein, da die Ausbildung des Vierrings aufgrund der starken Abstoßung der p_π -Elektronen beider Schwefelatome energetisch ungünstig ist. In Übereinstimmung damit sind 1,2-Dithietanringe bislang nur bei Sulfoxiden bekannt (BLOCK 1980). DMPS wäre somit zur Bildung von intermolekularen Disulfiden "gezwungen".

Ein erster Schritt zur Darstellung von oxidierten DMPS-Oligomeren war die mit Jod ausgeführte Oxidation in hoher Verdünnung. Gelchromatografische Messungen zeigten eine deutliche Verschiebung der Hauptfraktion zu niederen Molekulargewichten. Als bessere Methode erwies sich aber die von Field und Cragg entwickelte Oxidation des Pb-Addukts mit elementarem Schwefel (FIELD 1969; CRAGG 1973). Das Prinzip der Reaktion zeigt Abb.13.

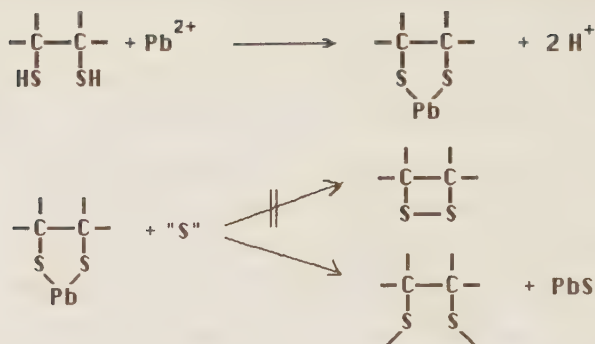
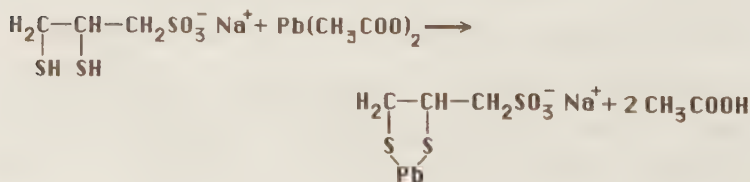


Abb.13: Disulfidbildung durch Oxidation mit Schwefel nach Field/Cragg

In einer zweistufigen Synthese mußte zunächst das Pb-Addukt dargestellt werden, das in der zweiten Reaktion mit elementarem Schwefel zum Disulfid oxidiert wurde.

5.3.1 Darstellung des Pb-DMPS-Adduktes

a) Reaktionsgleichung:



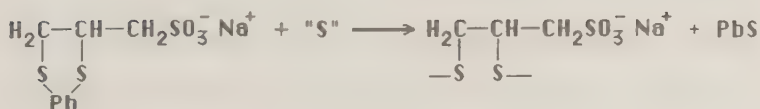
b) Synthesevorschrift:

11.4 g (= 0.05 mol) rac-DMPS-Natrium-Monohydrat wurden in 20 ml H₂O gelöst und bei RT zu einer Lösung von 19.3 g (= 0.051 mol) Blei(II)-acetat-trihydrat in 30 ml H₂O getropft. Am Ende der Zugabe wurde die zitronengelbe Suspension noch 0.5 h gerührt, dann 50 ml Aceton zugegeben und abgesaugt. Der Filtrückstand wurde in 30 ml Aceton/0.1 M Natriumacetatlsg. (3+1) suspendiert, erneut abgesaugt und mit 10 ml der gleichen Lösung gewaschen, dann mit 10 ml Aceton / Wasser (3+1) und schließlich mit reinem Aceton solange nachgewaschen, bis kein Geruch nach Essigsäure mehr wahrnehmbar war. Schließlich wurde der intensiv gelbe Rückstand über CaCl₂ getrocknet.

Ausbeute: 20.5 g Blei-Addukt (= 95 % d.Th.)
gelbes, schmieriges Pulver; Smp.: 215-217 °C (Zers.)

5.3.2 Darstellung von oxidiertem DMPS (oxDMPS_x)

a) Reaktionsgleichung:



b) Synthesevorschrift:

8.7 g (= 0.02 mol) DMPSPbNa-Monohydrat und 0.67 g Schwefel wurden in 250 ml Benzol + 2 ml CS₂ suspendiert und unter Schutzgas (N₂) 3 Tage bei RT gerührt. Gegen Ende war das Reaktionsgemisch intensiv braun gefärbt. Nun wurden 50 ml Wasser zugegeben, die unlöslichen Bestandteile abfiltriert und die wässrige Phase im Scheidetrichter abgetrennt. Die organische Phase wurde zweimal gewaschen und verworfen. Die wässrigen Phasen wurden vereint und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1.4 g oxDMPS_x-Rohprodukt (= 31 % d.Th.)

fbl. Pulver; Smp.: 250-252 °C (Zers., beg. > 230 °C)

Zur weiteren Reinigung wurde das Pulver in 3 ml NH₄⁺-Format-Puffer (1 mM, pH 6.5) auf eine Gel-Säule (Bio-Gel P 2; d_i= 30 mm, h_{Gel}= 500 mm) gegeben und bei 4 °C mit dem gleichen Puffer eluiert. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Photometer (Uvicord S, LKB) bei 206 nm. Das Chromatogramm ist in Abb.14 A gezeigt.

Der niedermolekulare Anteil (Balken in Abb.14 A) vor dem intensiv gelben Hauptprodukt (vgl. Abschn. 5.3.3) wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Der farblose Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und auf der analytischen HPLC (Elutionsbedingungen vgl. Materialien, Abschn. E) getrennt. Die Ausgangssubstanz DMPS ergab das in Abb. 14B gezeigte Chromatogramm zum Vergleich, während die niedermolekulare Fraktion der Gelsäule das in Abb.14C gezeigte HPLC-Chromatogramm mit mehreren "peaks" bot. In 20 aufeinander folgenden 100µl-Injektionen (ca. 5 mg/ ml Rohmaterial) wurde nun die Fraktion

mit der größten Fläche "herausgeschnitten", gefriergetrocknet und in Wasser aufgenommen. Rechromatografie dieser Fraktion unter gleichen Bedingungen ergab erneut ein ähnliches Chromatogramm (Abb.14D) u.s.f., so daß davon ausgegangen werden muß, daß die verschiedenen Disulfid-Formen miteinander im Gleichgewicht stehen. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn ohne UV-Detektion chromatografiert wurde. Eine Reduktion des Gemischs mit $\text{Zn}/\text{H}_3\text{PO}_4$ lieferte größtenteils wieder das Ausgangsprodukt (Abb.14 E).

Eine kryoskopische Molgewichtsbestimmung der niedermolekularen Fraktion aus der Gelchromatografie ergab ein mittleres Molgewicht von ≈ 492 , (berechnet für das Dimer: 452.5) (Dr. R. Pasch, anorg.-chem. Inst. d. Univ. Köln).

c) Nachbemerkung:

Oxidationsprodukte von DMPS wurden auch erhalten, wenn der Schwefel anstelle von Benzol/Schwefelkohlenstoff in $\text{H}_2\text{O}/\text{CS}_2$ (250 ml + 2 ml) aufgenommen wurde. Fast ausschließlich wurde hierbei allerdings die Bildung des fünfgliedrigen 1,3-Dithiolan-2-thion-Ringes beobachtet. Diese Substanz ist bislang auf andere Weise dargestellt worden, so daß auf die neue Darstellungsweise im folgenden Abschnitt kurz eingegangen wird.

In reinem Benzol (ohne CS_2) fand bei Raumtemperatur nach 7 Tg. keine Umsetzung statt. In der Siedehitze hatte die Substanz nur unter Zersetzung reagiert.

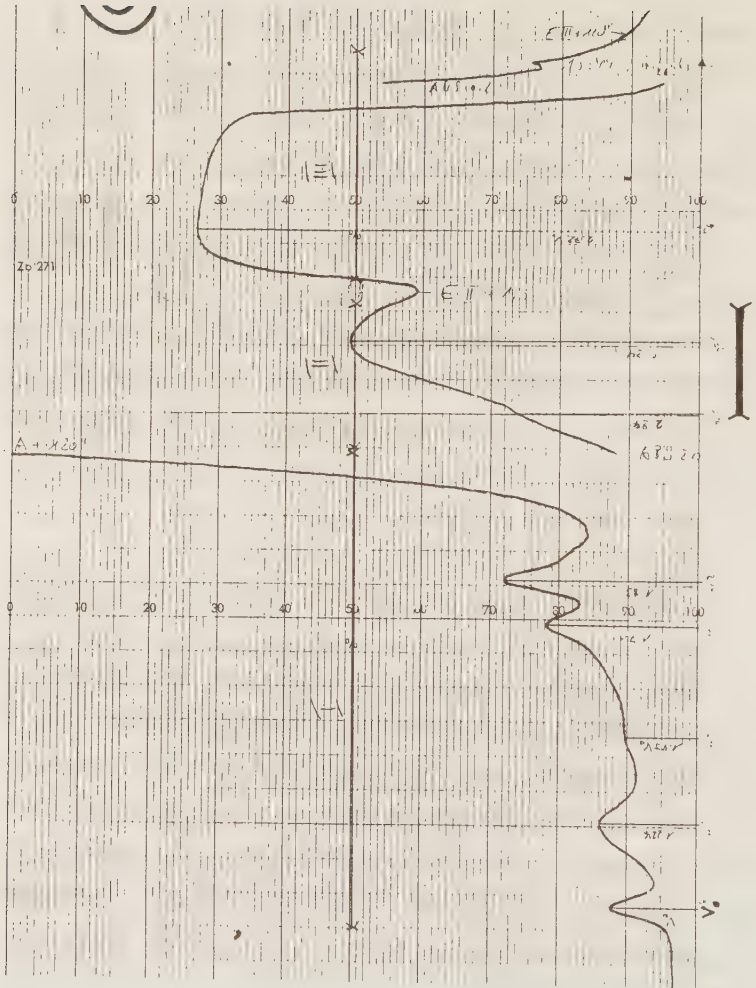


Abb.14 A: Gelchromatogramm der Oxidationsprodukte von DMPS
 Gel: Bio-Gel P2; Eluent: 1 mM $[\text{NH}_4]^+$ -Formiat-Puffer,
 pH 6.5; UV-Detektion 206 nm

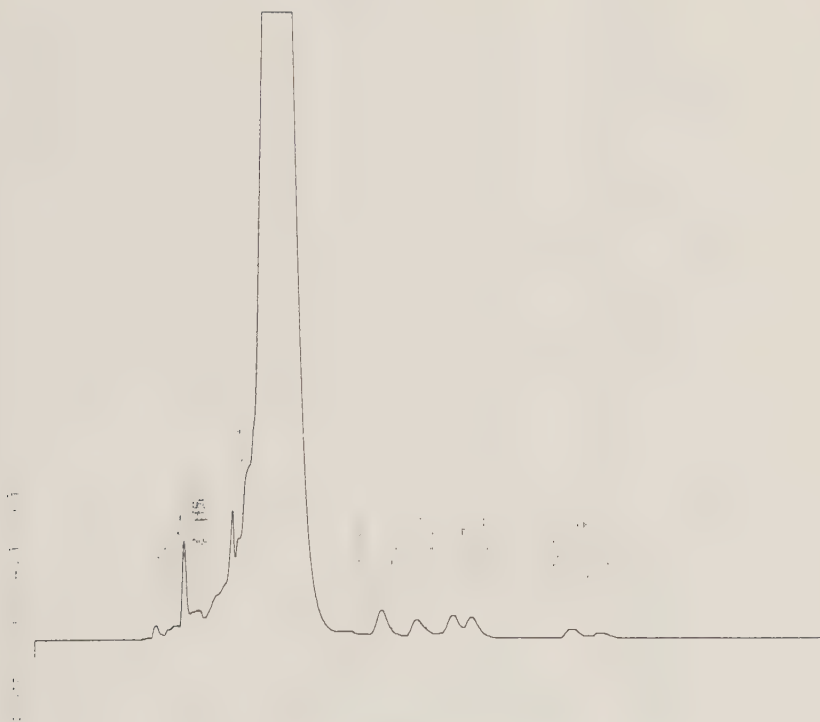


Abb.14B: HPLC-Chromatogramm von frisch aufgelöstem DMPS. Bedingungen für B - E: Säule OSD Shandon "Hypersil" 5 μ , RP 18, 250 x 4.6 mm, Eluent: 10 mM KH_2PO_4 , pH 2.5 / Acetonitril (9 + 1), 1.0 ml/min; UV-Detektion 210 nm

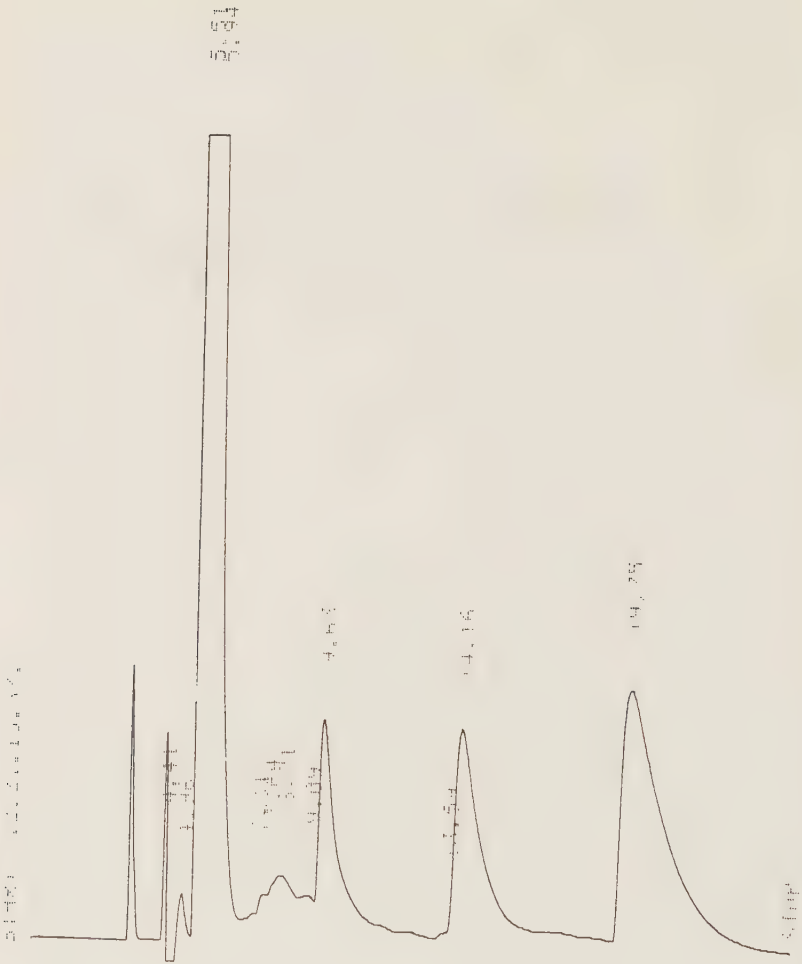


Abb.14C: HPLC-Chromatogramm der niedermolekularen Fraktion aus Abb. 14 A

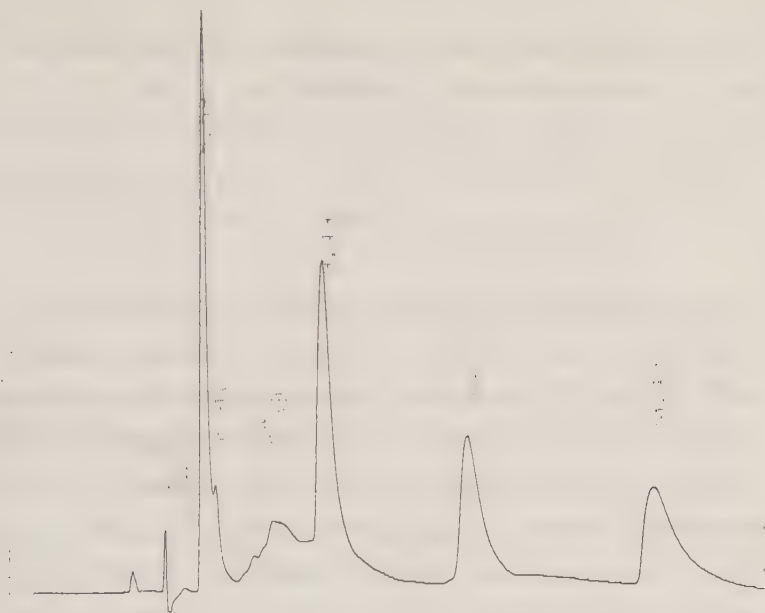


Abb.14D: Rechromatografie der in Abb. 14C geschnittenen Fraktion

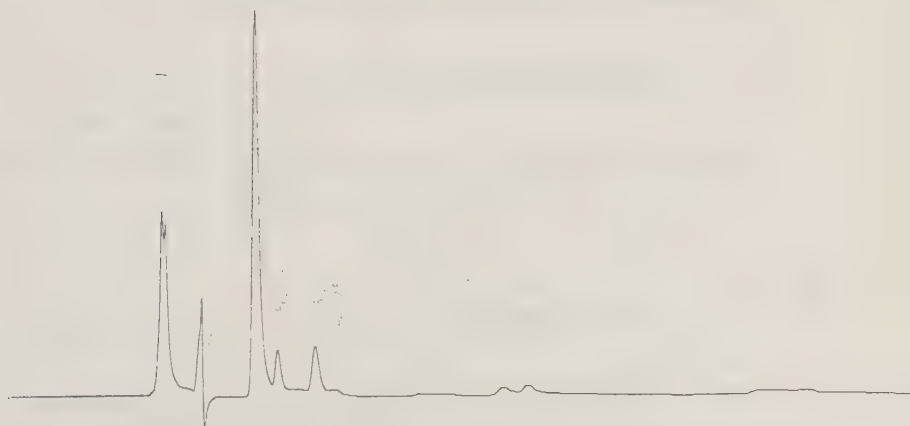


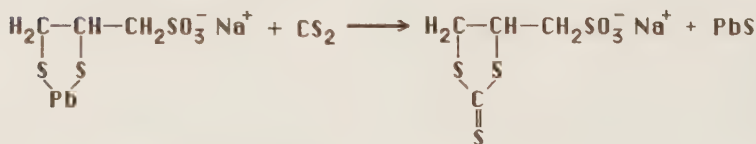
Abb.14E: HPLC-Chromatogramm der mit $\text{Zn}/\text{H}_3\text{PO}_4$ reduzierten Fraktion aus Abb.14C

5.3.3 Darstellung von 1,3-Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonat-Natrium-Salz (DTMS)

a) Vorbemerkung:

Das Trithiocarbonat des DMPS war bereits von einer russischen Arbeitsgruppe bei der Umsetzung von DMPS mit Tetramethylthiuramdisulfid oder mit CS_2 in alkalischer Lösung beschrieben worden (LYSENKO 1974). An gleicher Stelle wurde auch die Möglichkeit der Darstellung von Trithiocarbonaten über die Blei-Addukte der korrespondierenden Dithiole aufgezeigt, für DMPS jedoch nicht durchgeführt. Überraschenderweise verlief diese Additions / Eliminationsreaktion unter milden Bedingungen erstaunlich glatt mit brauchbarer Ausbeute. Über die Bedeutung dieses Reaktionsprinzips zur qualitativen Abschätzung von Komplexstabilitäten vgl. Abschn. 5.4.1.

b) Reaktionsgleichung:



c) Synthesevorschrift:

Zu einer Suspension von 4.34 g (= 0.01 mol) DMPSPbNa-Monohydrat in 50 ml H_2O wurden 0.35 g (= 0.01 mol) Schwefel, gelöst in 3 ml CS_2 , gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde intensiv bei Raumtemperatur gerührt, wobei bereits nach 5 min eine ständig intensiver wer-

dende Gelbfärbung den Beginn der Reaktion anzeigte. Die Farbe wechselte im Verlauf von gelb nach tiefrot, bis die Fällung von schwarzem Bleisulfid zu einer Phasentrennung (Überstand gelb!) führte. Nach 24 h wurde abgebrochen und der dunkle Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet und hinterließ einen gelben Rückstand.

Ausbeute: 2.12 g Trithiocarbonat (roh) (= 78 % d.Th.)

Zur weiteren Reinigung wurden 1.73 g Rohprodukt in 10 ml NH_4^+ -Formiat-Puffer (1 mM, pH 6.5) gelöst und auf einer Gelsäule (Bio-Gel P2) mit dem gleichen Puffer chromatografiert (vgl. Abschn. 5.3.2).

Das Eluat ergab 3 verschiedene Fraktionen, die nach Gefriertrocknung analysiert wurden: (V_A = Ausschlußvolumen)

1.Fr. ($V_A - 2.2V_A$): 23 mg; fbl. Pulver; Smp.: 218-221 °C (Zers.)

2.Fr. ($2.3V_A - 2.5V_A$): 50 mg; fbl. Pulver; Smp.: 232-234 °C (Zers.)

3.Fr. ($2.5V_A - 3.2V_A$): 1630 mg; gelbes Pulver; Smp.: >271 °C (Zers.)

Die letzte Fraktion enthielt das Trithiocarbonat, das aus H_2O umkristallisiert wurde:

gelbe Prismen, Smp.: 286 - 288 °C (Zers.)

(Lit.: 235 - 240 °C (Zers.))

Elementanalyse: $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{S}_4\text{Na}$ FG = 252.33

	C	H	S	Na
Ber.:	19.04	2.00	50.82	9.11 %
Gef.:	19.13	2.14	50.74	9.02 %

Das ^1H -NMR-Spektrum des Monohydrats zeigt Abb.15. Man erkennt bei 3.6 ppm das ψ -Triplett der $-\text{CH}_2\text{-SO}_3$ -Protonen. Das Signal bei 4.3 ppm dürfte den Protonen von C5 des Dithiolan-Ringes zuzuordnen zu sein. Das Singulett bei 4.8 ppm stammt vom Kristallwasser und überlagert das ψ -Quintett des C4-Protons.

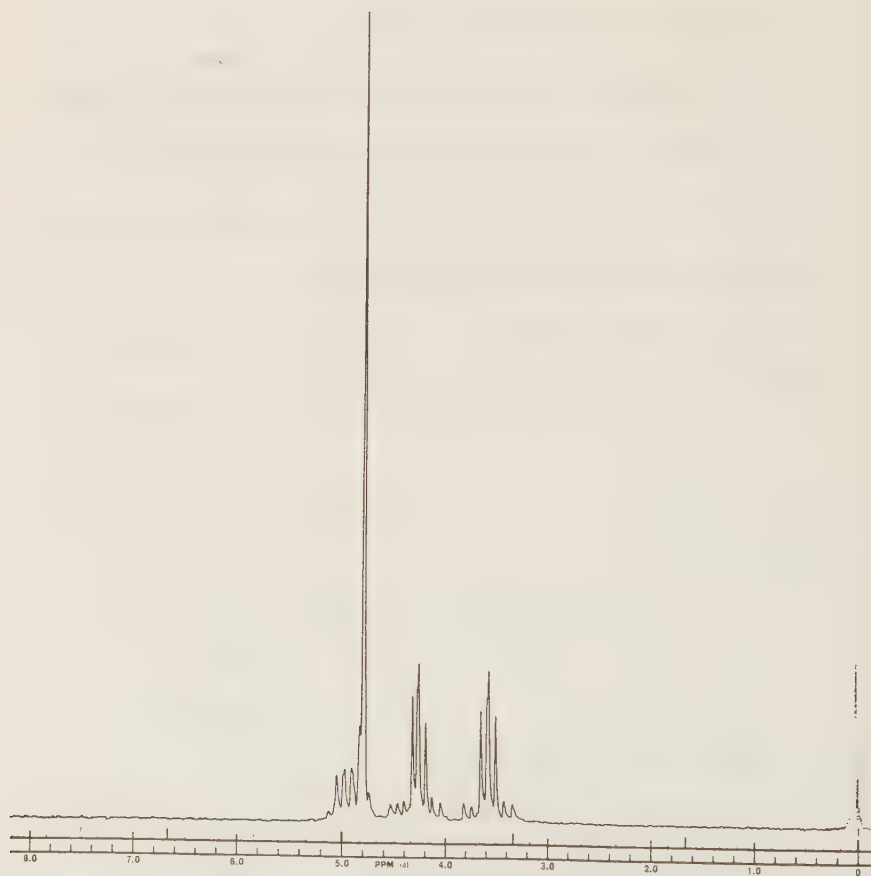


Abb. 15: 200 MHz ^1H -NMR-Spektrum von DTMS

5.4 in-vitro Untersuchungen zum Vergleich von DMPS und DMSA

DMPS und DMSA sind gegenwärtig die am meisten favorisierten Alternativen zu BAL. Beide besitzen bei guter Wasserlöslichkeit eine geringe akute Toxizität (vgl. Tab. 2). Leider gibt es bislang in der Literatur keine vergleichenden Untersuchungen ihrer Pharmakokinetik, so daß diesbezügliche Unterschiede weitgehend unbekannt sind. In den beiden folgenden Abschnitten wird über vorläufige Untersuchungen zur Frage der Komplexstabilitäten und zur Frage der Oxidationsempfindlichkeit beider Substanzen im Vergleich berichtet.

5.4.1 Qualitative Abschätzung der relativen Stabilität verschiedener Metallkomplexe von DMPS und DMSA in wässriger Lösung

a) Vorbemerkung:

Die Leichtigkeit der Reaktion des Pb-Adduktes von DMPS mit Schwefelkohlenstoff gab Anlaß zu Untersuchungen über die Rolle des Metalls beim Ablauf der Reaktion.

Allgemein liegt für eine Reaktion vom Typ



die formal als Ersatz des Metalls durch die C=S-Gruppe betrachtet werden kann, die Triebkraft im Unterschied der freien Enthalpie (ΔG) zwischen Edukten und Produkten. Für den tatsächlichen Ablauf der Reaktion sind aber neben thermodynamischen Faktoren, die die Lage des Gleichgewichts bestimmen, vor allem kinetische Parameter entscheidend (vgl. dazu Abschn. 3.2 und die dort zitierte Literatur).

Unter der Voraussetzung, daß bei den hier untersuchten Metalladdukten infolge der hohen Tendenz zur Bildung schwerlöslicher Sulfide das (thermodynamische) Gleichgewicht auf der rechten Seite der obigen Reaktionsgleichung liegt, wurde in erster Näherung erwartet, daß alle Dimercaptide ähnlich glatt mit Schwefelkohlenstoff reagierten wie das Bleiaddukt.

(Die Löslichkeiten der binären Schwermetallsulfide sind sehr gering, ihre Konstanten gut bekannt (Tab.4). Eventuelle Unterschiede im Reaktionsverhalten würden dabei Unterschiede in den Löslichkeiten der gebildeten Sulfide widerspiegeln, die für eine (vollständige) Gleichgewichtsverschiebung entscheidend sind.)

Diese Hypothese wurde mit verschiedenen Metallen der H_2S - und $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ -Gruppe des allgemeinen Kationentrennungsganges (JANDER 1970) untersucht. Abweichungen von diesem Verhalten wären ein Hinweis auf Unterschiede in den (kinetischen) Stabilitäten der eingesetzten Metalladdukte (im Verhältnis zu den gebildeten Metallsulfiden).

Als variabler Parameter diene der pH-Wert, der wenigstens in zweifacher Hinsicht auf das Reaktionsgeschehen Einfluß nimmt:

- 1) die Löslichkeit der Sulfide nimmt mit steigender Basizität des Mediums ab, da konkurrierende Hydrogensulfidbildungen weitgehend unterdrückt werden (SEEL 1963),
- 2) die Nucleophilie des Schwefels steigt in alkalischer Umgebung infolge der stärkeren Bindungspolarisierung an (MARCH 1977).

Beide Effekte bewirken eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes nach rechts, wobei wiederum Abweichungen von der Reihenfolge der Löslichkeiten Unterschiede im Verhältnis der Komplexstabilitäten bedeuten würden.

b) Versuchsdurchführung:

Aus den Chloriden von Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} und Zn^{2+} , sowie aus NaAsO_2 und FeSO_4 wurden 5 mM Lösungen in 0.05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.0, der zuvor entgast und mit N_2 durchspült worden war, hergestellt. Mit dem gleichen Puffer wurden 5mM Lösungen von DMPS und DMSA angesetzt. Außerdem wurden acht verschiedene Tris-Puffer (0.15 M) mit HCl auf pH-Werte 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 und 10.5 exakt eingestellt und entgast.

Zu Beginn des Versuchs wurden in parallelen Reihen in 1.5 ml-Reaktionsgefäße für jedes Metall 0.75 ml pH-Puffer + 0.25 ml CS_2 pipettiert, die Gefäße verschlossen und bei 25 °C thermostatisiert. Dann wurden stöchiometrische Mengen der Metallsalze und Dithiole zur Ausbildung der Komplexe zusammengegeben (0.5 ml + 0.5 ml). Von den Komplexlösungen wurden jeweils 0.1 ml in die pH-Lösungen pipettiert und auf einem Thermoschüttler im geschlossenen Gefäß 10 min lang bei 25 °C geschüttelt.

	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺	As ^{III}	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Hg ²⁺
BAL	Farbe	fbl.	fbl.	rosa	fbl.	fbl.	gelb	blau	fbl.
	Ndg.	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	ja
DMPS	Farbe	fbl.	fbl.	rot	fbl.	fbl.	gelb	blau	fbl.
	Ndg.	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja
DMSA	Farbe	fbl.	fbl.	rot	fbl.	fbl.	gelb	lila	fbl.
	Ndg.	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja
pK _L Werte der binären Sulfide	?	?	21.6	21.7	25.3	27.9	28.6	40.2	51.2

Tab.4: Eigenschaften der Addukte verschiedener Metalle mit BAL, DMPS und DMSA in equimolaren Konzentrationen (5 mM). Bei Niederschlagsbildung konnte dieser durch Zugabe von überschüssigem Dithiol weitgehend in Lösung gebracht werden. Zum Vergleich werden die pK-Werte der Löslichkeitsprodukte für die binären Sulfide (MS u. M₂S₃) bei 25 °C in wässriger Lösung angegeben.

Quellen: BARRON 1947a; JANDER 1970; WIBERG 1985; eigene Beobachtungen

Als positiv wurde stets das erste Gefäß der aufsteigenden pH-Reihe gewertet, bei dem nach Ablauf von 10 min mit bloßem Auge eine deutliche Gelbfärbung erkennbar war. In Kontrollversuchen wurde festgestellt, daß nicht auch in Abwesenheit der Dithiole Färbungen auftraten. Dabei zeigte sich, daß die Bildung von (Metall)Xanthaten offenbar erst bei pH-Werten > 11.5 zögernd einsetzte. Im Falle des gelblichen Blei-Adduktes diente ein Blindwert zur Kontrolle der Farbänderung.

c) Ergebnisse:

Die Bildung von Trithiocarbonaten aus verschiedenen Metalldimercaptiden von DMPS und DMSA ist in Abb.16 in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung dargestellt.

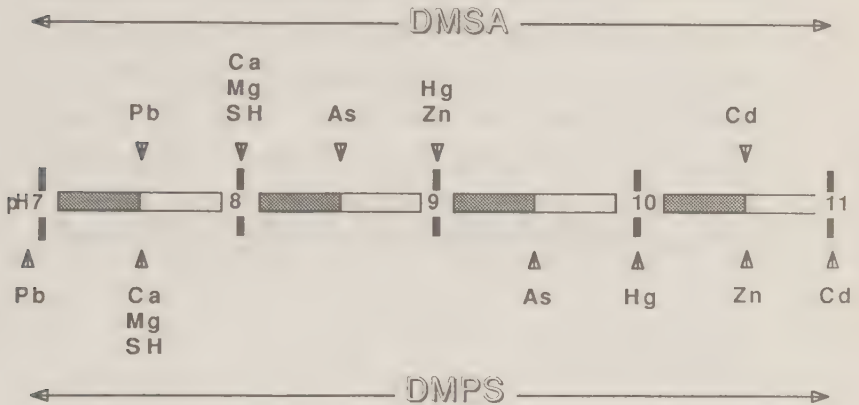


Abb. 16: Kinetische Stabilität verschiedener Metallkomplexe von DMPS und DMSA bei der Bildung von Trithiocarbonaten in Abhängigkeit vom pH-Wert. Angegeben ist jeweils derjenige pH-Wert, bei dem sich der Testansatz mit CS_2 innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur deutlich gelb färbte. (Weitere Erläuterungen im Text)

Dabei ergaben sich für beide Dithiole qualitativ ähnliche Reihen, die jedoch nicht der Reihenfolge der entsprechenden Löslichkeiten der Sulfide folgten. Erst unter deutlich alkalischen Bedingungen reagierten in

beiden Reihen die Cd-Komplexe, zuvor wurden die Zn-Komplexe umgewandelt. Vergleichsweise reaktiv waren die Blei-Addukte, die noch vor den freien Dithiolen reagierten. Aus diesen Abweichungen von der Reihenfolge der Löslichkeiten kann geschlossen werden, daß die Stabilität der Cd- und Zn-Verbindungen gegenüber Sulfidbildung höher als im Falle von Pb und Hg ist. Arsen nimmt dabei eine Mittelstellung ein.

5.4.2 Oxidationsempfindlichkeit von DMPS, DMSA und BAPSA

a) Vorbemerkung:

In der Literatur werden DMPS und DMSA als relativ stabil gegen Luftoxidation angesehen (APOSHIAN 1983). Für BAPSA, das keine freien SH-Gruppen besitzt, sollte diese Feststellung erst recht zutreffen. Barron u. Mitarbeiter hatten bei BAL festgestellt, daß dieses Dithiol zu den trägen Redoxsystemen gehört, daß jedoch in Gegenwart von Metallionen die Oxidationsgeschwindigkeit dramatisch zunimmt, wobei Cu^{2+} und (deutlich schwächer) Fe^{3+} besonders effektiv sind, während Mn^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} keinen Einfluß hatten (BARRON 1947a).

Da der komplette Ausschluß katalytischer Spuren von Metallionen technisch problematisch ist, wenn man auf den Einsatz von Komplexbildnern und Stabilisatoren verzichten muß, war es von Interesse, etwas über die Stabilität der Dithiollösungen zu erfahren, die bei den in vitro und in vivo Versuchen eingesetzt wurden. Anstelle der üblichen, isoto-

nen NaCl-Lösungen wurden bei den nachstehenden Untersuchungen jedoch Phosphat-gepufferte Salzlösungen eingesetzt, um ggf. den Einfluß des pH-Wertes besser abschätzen zu können.

Die Detektion der aktiven Dithiole (= freie SH-Gruppen) wurde dabei photometrisch mit Ellman's Reagenz (ELLMAN 1959) und gleichzeitig jodometrisch nach der Methode von Woodward (WOODWARD 1932) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die jodometrische Titration nur bei DMPS reproduzierbare Ergebnisse lieferte, während bei DMSA - insbesondere bei erhöhten Temperaturen - der tatsächliche Verbrauch von Jod stets höher als die theoretisch möglichen Mengen lag, was den Ablauf von Nebenreaktionen vermuten ließ. Die jodometrische SH-Gruppen-Bestimmung ist also im Falle von DMSA nicht anwendbar.

b) Versuchsdurchführung:

Von DMPS, DMSA und BAPSA wurden 1 mM Lösungen in Dulbecco's PBS (500 ml) hergestellt, wobei die Meßkolben mit Parafilm® verschlossen wurden, um einen freien Gasaustausch zu ermöglichen. Die Meßkolben wurden thermostatisiert und periodisch durchgeschüttelt (2 mal/Tag). Zu bestimmten Zeiten wurden Proben für die photometrische bzw. jodometrische SH-Gruppen-Bestimmung gezogen und unmittelbar gemessen.

ba) photometrische SH-Gruppen-Bestimmung (ELLMAN 1959):

In 3 ml-Küvetten wurde pipettiert:

	Leerwert	Probe
0.15 M Tris/HCl-Puffer, pH 8	2.50 ml	2.50 ml
10 mM DTNB-Lösung	0.10 ml	0.10 ml
Dulbecco's PBS	0.25 ml	- . -
1 mM Dithiol-Lösung in PBS	- . -	0.25 ml

Mit einem Plastikspatel wurde der Küvetteninhalt gut durchmischt und nach ca. 3 min der Extinktionsunterschied von Probe und Leerwert bei 412 nm bestimmt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen ausgeführt. Die Berechnung des Dithiol-Gehaltes der Lösung erfolgte nach der Formel

$$c = \frac{E \cdot V_K}{2 \cdot \epsilon_{412} \cdot d \cdot V_P}$$

wobei E die Extinktion, V_K das Meßvolumen in der Küvette, V_P das zugegebene Probenvolumen, d ($= 1$ cm) die Schichtdicke und ϵ_{412} den molaren Extinktionskoeffizienten von DTNB ($= 13600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) bedeuten.

b) jodometrische SH-Gruppen-Bestimmung (nur DMPS) (WOODWARD 1932):

In einen 50 ml Weithals-Erlenmeyer-Kolben wurden gegeben:

10.0 ml	10 %ige Sulfosalicylsäure (w/v)
10.0 ml	1 mM Dithiol-Lösung in PBS
3 Tropfen	1 %ige Stärke-Lösung
10 mg	Kaliumjodid

Die Mischung wurde dann unter ständigem Umschwenken mit 1 mM KJO_3 -Lösung titriert, bis eine zarte Blaufärbung für ca. 1 min bestehen blieb. Es wurden Doppelbestimmungen ausgeführt. Ein Blindwert enthielt PBS anstelle der Dithiollösung und zeigte auf den zweiten Tropfen einen Farbumschlag.

Für die Berechnung des SH-Gehaltes wurde angesetzt:

$$1 \text{ ml } 1\text{mM } \text{KJO}_3 = 6 \mu\text{mol SH}$$

c) Ergebnisse:

Die zeitliche Änderung des SH-Gehaltes von DMPS bei verschiedenen Temperaturen zeigt Abb.17A für die jodometrische und Abb.17B für die photometrische Messung. Beide Kurvenscharen für DMPS sind erwartungsgemäß praktisch deckungsgleich, während im Falle von DMSA der Jodverbrauch stets höher lag (ohne Abb.).

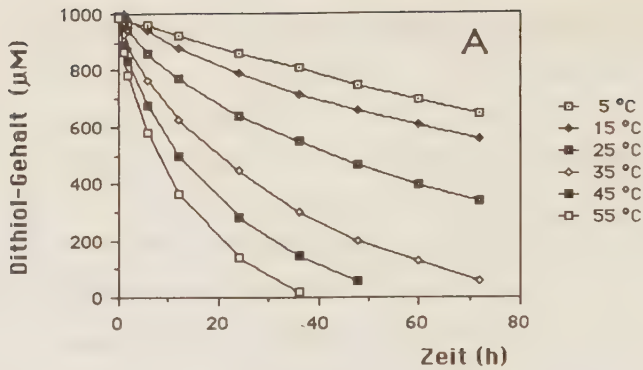


Abb.17 A: Jodometrische Bestimmung der zeitlichen Abnahme der SH-Aktivität von DMPS(1mM) in Dulbecco's PBS, pH 7, bei verschiedenen Temperaturen. (Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen.)

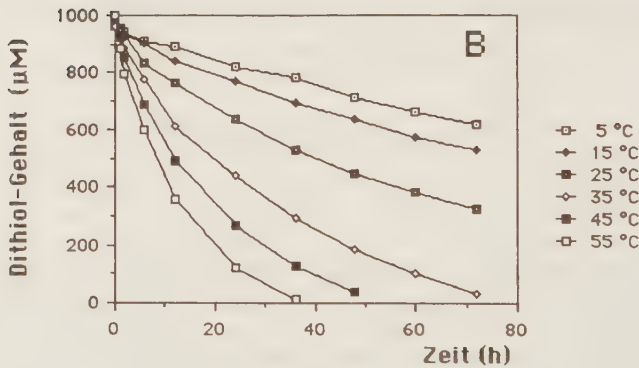


Abb.17 B: wie in A, aber photometrische Bestimmung mit Ellman's Reagenz

In Abb.18 ist für DMPS und DMSA bei verschiedenen pH-Werten der Thiol-Gehalt in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

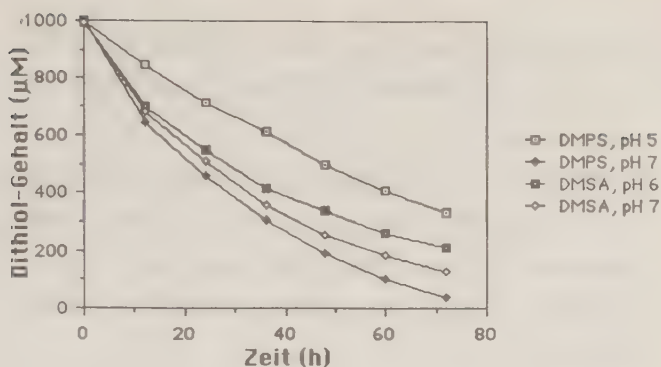


Abb. 18: Zeitliche Abnahme der SH-Aktivitäten von DMPS und DMSA in PBS bei verschiedenen pH-Werten; alle Lösungen wurden auf 35 °C thermostatisiert. Die SH-Bestimmung erfolgte photometrisch mit Ellman's Reagenz.

Für BAPSA konnte eine Änderung des SH-Gehaltes infolge einer möglichen Hydrolyse der Thioesterbindungen nicht beobachtet werden. Oberhalb von 35 °C wurde BAPSA nicht untersucht. Die Messungen zeigen, daß die Abnahme der SH-Aktivitäten durch Temperatur- und/oder pH-Erhöhung beschleunigt wird, wobei tendenziell DMSA etwas weniger pH-sensibel zu sein scheint als DMPS. Zu beachten ist, daß die Messungen im Falle von DMPS bei pH 5 und 7, bei DMSA jedoch bei pH 6 und 7 durchgeführt wurden. Bei pH 5 konnte DMSA im vorliegenden Konzentrationsbereich nicht vollständig in Lösung gebracht werden.

6. Untersuchung der Wirksamkeit einiger Verbindungen bei der Vergiftung mit As_2O_3

Zur Prüfung der biologischen Wirksamkeit geschützter Dithiole bei der Vergiftung mit As_2O_3 wurde ein in-vitro-Test (Rattennierentubuli) und ein in-vivo Test (NMRI-Maus) benutzt, wobei im Tierversuch nur die beiden neu dargestellten Substanzen (BAPSA, DTMSA) eingesetzt wurden.

6.1 in vitro-Prüfung der Wirksamkeit an Nierentubulizellen der Ratte

Die Niere ist bei der Arsenvergiftung aus zweierlei Gründen als wichtiges Organ einzustufen:

- a) aufgrund ihrer hohen Stoffwechselleistung besitzt sie gegenüber As_2O_3 eine große Empfindlichkeit (zum Mechanismus vgl. Abschn. 2.3);
- b) da die Elimination von resorbiertem Arsen fast ausschließlich über die Nieren erfolgt (vgl. Abschn. 2.2), sind nach eingetretener Vergiftung in diesem Organ deutliche Belastungen zu erwarten.

Die Blockierung wichtiger Stoffwechselwege der Zellen ist entscheidend für das Verständnis der Arsenvergiftung (vgl. Abschn. 2.3). Zu den zahlreichen Parametern, die zur Beurteilung der Vitalität vergifteter Zellsysteme dienen können, zählt auch die Hemmung der Glucoseogenese in Nierentubulizellen von nüchtern gesetzten Ratten

(SZINICZ 1979). Sie ist ein empfindlicher Parameter zur Objektivierung der Arsenvergiftung (vgl. Abschn. 2.3). Die Prüfung der biologischen Wirksamkeit potentieller Antidote gegen Arsen an (vergifteten) Rattennierentubuli ist daher ein geeignetes in-vitro Verfahren (L. SZINICZ, W. FORTH, Arch. Toxicol., im Druck).

a) Präparation von Rattennierentubuli

(Guder 1971,1974; Szinicz 1979)

Vier männliche Sprague-Dawley-Ratten (250 - 290 g) wurden 24 h vor dem Versuch nüchtern gesetzt (aqua ad lib.). Zur Organentnahme wurden die Tiere narkotisiert (ca. 1.2 ml Nembutal®/kg i.p.). Nach 5 - 15 min wurde die Bauchdecke vom Becken her mit einer Schere V-förmig eröffnet, das Gekröse linksseitig verlagert und die Leberpforte freigelegt (Abb.19).

Die Vena portae wurde locker mit einem Zwirnfaden ligiert und nach Injektion von 0.2 ml Heparin-Na (≈ 500 I.E.) in die V. cava inf. inzidiert. An dieser Stelle wurde sofort eine Kunststoffkanüle ($d_i \approx 0.5$ mm) eingeführt und durch die Ligatur fixiert. Nach Inzision der V. cava inf. wurde das Tier mit 150 ml Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert und ausgeblutet (Abb.20).

Mit Hilfe einer Schere wurden die hell gefärbten Nieren herausgelöst, am Hilus abgetrennt und in einer Glasschale auf Eis aufbewahrt. (Nicht ausgeblutete Nieren imponierten durch eine rotbraune Farbe und wurden verworfen.)

Zur Dissoziation des Gewebes wurde zunächst die Nierenkapsel entfernt und jede Niere vom margo lat. her mit einem Skalpell halbiert (Abb.21).

Mit einem scharfen Löffel wurde dann die weiße Innenzone des Marks herausgeschält. Das übrige Gewebe wurde zur grob-mechanischen Zerkleinerung durch ein Kunststoffsieb gedrückt und zur Bestimmung des Feuchtgewichts auf Parafilm® gesammelt. Die Feuchtgewichte von 8 Nierenresten lagen üblicherweise bei ca. 7 g.

Zur enzymatischen Dissoziation wurde die gesamte Masse zusammen mit 1 Gew.-% Collagenase in 70 ml Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) suspendiert, auf drei Portionen verteilt, mit Carbogen (= 95 % O₂+5 % CO₂) 1 min lang begast, verschlossen und 45 min lang in einem Wasserbadschüttler (37 °C, 500 rpm) geschüttelt. Nach dem Schütteln wurden die Portionen wieder in einem Meßzylinder vereinigt und genau 1 min lang stehen gelassen. Der Überstand wurde abdekantiert und zentrifugiert (1 min, 400 rpm o.Bremse = 150 x g). Das Sediment wurde in ca. 70 ml KHP resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment enthielt nun die fertige Tubulifraktion, wurde in ca. 20 ml KHP aufgenommen und bis zur Messung und Einstellung des gewünschten Eiweißgehaltes auf Eis aufbewahrt. Jeweils ein Aliquot wurde auf Vitalität getestet (Trypan-Blau-Ausschluß). Bei verwendbaren Präparationen war praktisch keine Farbstoffaufnahme festzustellen.

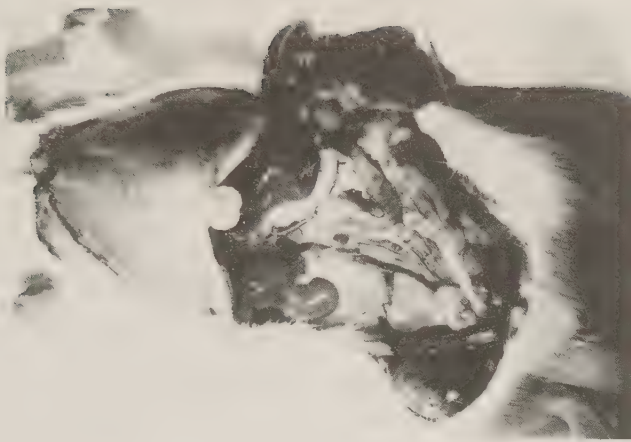


Abb.19: Ventraler Situs der Ratte mit freigelegter Leberpforte



Abb. 20: Situs nach Ligatur und Kanülierung der Pfortader



Abb. 21: Isolierte Rattennieren ohne Kapsel und halbiert

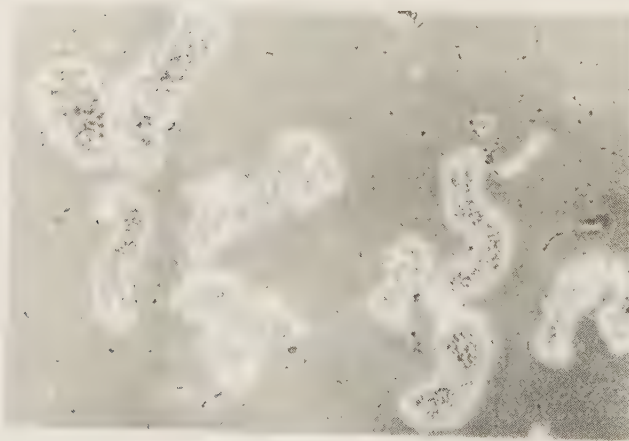


Abb. 22: Rattennierentubuli in Trypan-Blau (Phasenkontrast x 200)

b) Proteinbestimmung:

Die Bestimmung des Eiweißgehaltes erfolgte mit der Biuret-Methode und Rinderserumalbumin als Standard (BEISENHERZ 1953) gemäß nachstehendem Protokoll:

In ein 1.5 ml PP-Reaktionsgefäß wurden 1ml Dioxan und 50 µl Tubulususpension gegeben. Dann wurde 3 min geschüttelt und 2 min scharf zentrifugiert (Centrifuge). Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment zur Proteinfällung mit 1.0 ml 0.3 M Trichloressigsäure versetzt. Danach wurde wieder 3 min geschüttelt und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment mit 1.0 ml Biuret-Reagenz aufgenommen und ca. 45 min bei RT inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 546 nm gegen Biuret-Reagenz als Leerwert. Alle Messungen wurden als Vierfachbestimmungen ausgeführt und die entsprechenden Protein-Gehalte einer Eichkurve entnommen, die von 2.5 - 30.0 mg Protein/ml linear war.

c) Versuchsdurchführung:

Nachdem die Tubulususpension mit KH-Puffer auf den gewünschten Eiweißgehalt eingestellt worden war (Endkonzentration $\approx$ 2.0 mg/ml im Ansatz), wurden pro Inkubationsansatz in einen eisgekühlten 250 ml-PVC-Becher pipettiert:

2.0 ml Tubulususpension

0.1 ml 1 M Na-Pyruvat-Lsg.

0.1 ml 1.5 mM As_2O_3 -Lsg. (Kontrolle: NaCl-Lsg.)

7.8 ml KHP

Als Startpunkt wurde das Einsetzen der Becher in den Wasserschüttler bei 37 °C/100 rpm gewählt. Jeder Ansatz wurde ca. 30 sec mit Carbogen im schwachen Gasstrom oberflächlich begast, verschlossen und stetig geschüttelt. Jeweils nach 10 min wurde 1.0 ml der Suspension entnommen und zur Eiweißfällung in ein 1.5 ml-PP-Reaktionsgefäß, das 0.1 ml 3.3 M HClO_4 enthielt, gegeben. Der restliche Ansatz wurde erneut begast (ca. 30 sec) und wieder verschlossen. Nach der dritten Entnahme ($t = 30$ min) wurde vor der Begasung 70 μl Antidot-Lsg. (≈ 9 mM) bzw. NaCl-Lsg. (Kontrollen) zugegeben. Die letzte Entnahme erfolgte nach 60 min. Danach wurde erneut die Vitalität getestet. Übliche Werte für den Trypan-Blau-Ausschluß lagen bei 80 - 90 % (Abb. 22).

d) Glucosebestimmung:

Die Bestimmung der Glucose erfolgte enzymatisch (BERGMEYER 1974). Nach der Eiweißfällung der 1.0 ml-Aliquots wurden die Proben durch Zugabe von 0.2 ml 2.2 M KHCO_3 -Lsg. neutralisiert und nach Beendigung der Gasentwicklung scharf zentrifugiert (2 min, Centrifuge). Vom Überstand wurden 0.5 ml zu 0.5 ml Glucose-Puffer gegeben. Nach Durchmischung wurden von diesem Leerwert 0.5 ml mit 10 μl Enzymlsg. (= Hexokinase + Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Stammlsg. 1:50 verdünnt, entsprechend einer Aktivität von 0.48 U/ml bzw. 0.24 U/ml im Test) 15 min bei RT inkubiert. Die Messung des gebildeten NADPH erfolgte bei 334 nm gegen den Leerwert. Der Glucosegehalt wurde berechnet nach der Formel

$$c = \frac{E \cdot f_{\text{dil}} \cdot V_K}{\epsilon_{334} \cdot d \cdot V_P}$$

wobei E die Extinktion, V_K das Meßvolumen in der Küvette, V_P das zugegebene Probenvolumen, f_{dil} ($= 1.3$) den Verdünnungsfaktor, d ($= 1$ cm) die Schichtdicke und ϵ_{334} den molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH ($= 6180 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) bedeuten. Die berechneten Werte wurden dann auf den Proteingehalt bezogen.

e) Ergebnisse:

In allen Fällen betrug die zur Blockierung der Gluconeogenese aus Pyruvat eingesetzte Arsenkonzentration $30 \mu\text{M}$ im Ansatz. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte nach 30 min als 3facher molarer Überschuß ($= 90 \mu\text{M}$ im Ansatz). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit einzelner Verbindungen (BAL, DTMSA, BAPSA) wurden alle Substanzen in einer physiol. NaCl-Lösung mit 15 % (v/v) Ethanol angesetzt. Die Kontrollen erhielten die gleiche Lösung. Die DMSA-Lösung wurde mit NaHCO_3 solange versetzt, bis sich gerade alles gelöst hatte (APOSHIAN 1983). Alle Lösungen wurden frisch zubereitet, und der Thiolgehalt der eingesetzten Mercaptoverbindungen war größer als 90 % (Ellman's Reagenz).

Da im Laufe der Untersuchungen eine Vielzahl von Substanzen geprüft wurde, jedoch pro Versuch nur zehn Ansätze gemessen werden konnten, wurden in der nachfolgenden Darstellung die Ergebnisse von

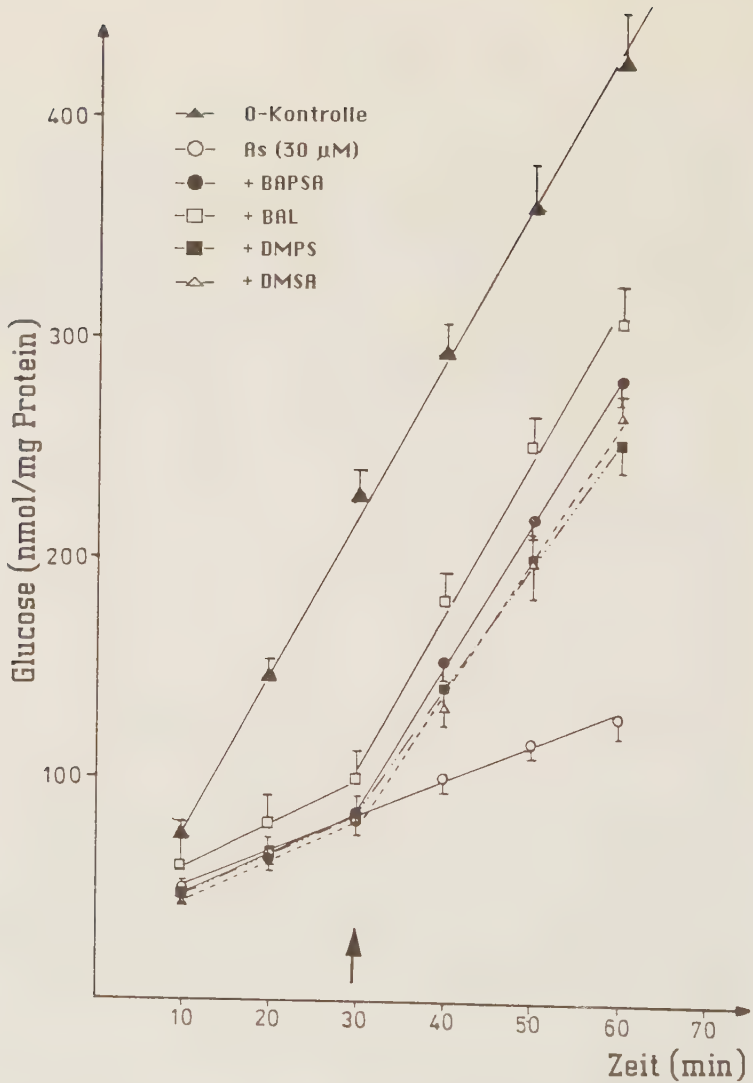


Abb. 23 A: Hemmung der Gluconeogenese in Rattennierentubuli durch Arsen (30 μM). Aufhebung der As-Vergiftung durch Zugabe versch. Antidote nach 30 min. Angegeben sind jeweils Mittelwerte + S.E.M.; >PFEIL> markiert den Zeitpunkt der Antidotzugabe.

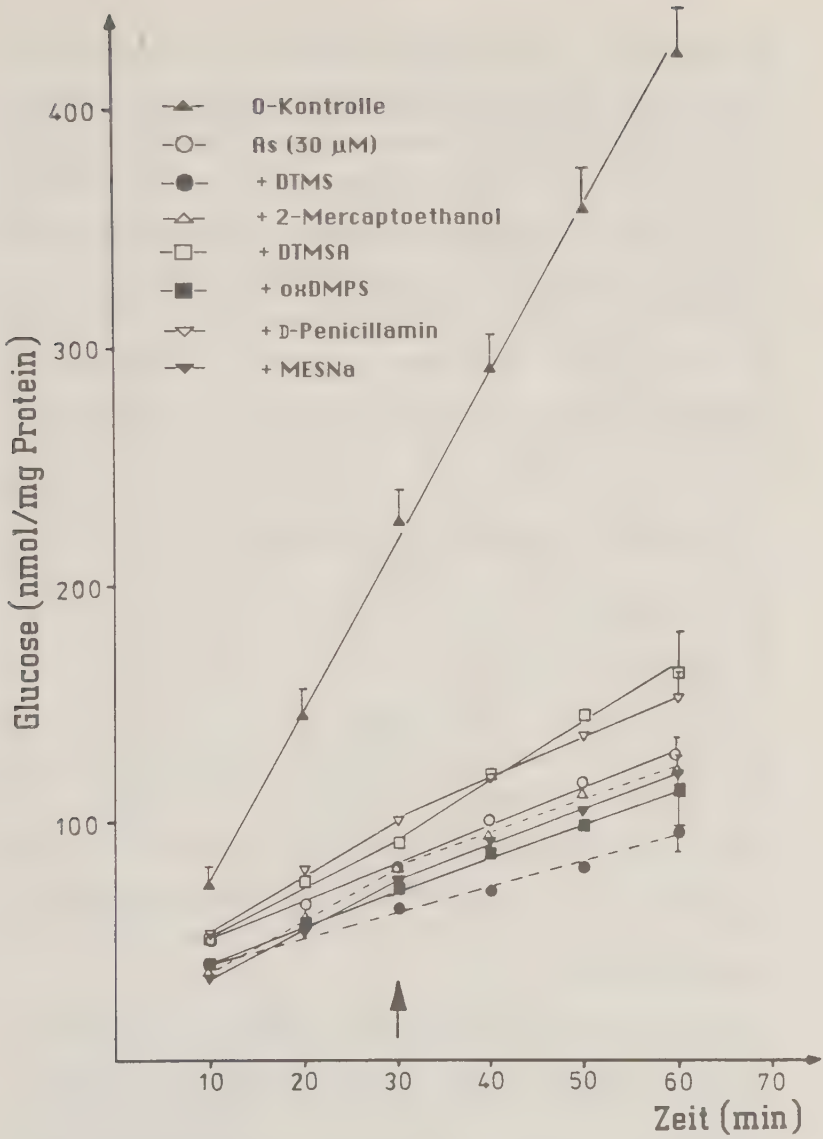


Abb. 23B: Substanzen ohne Antidotwirkung, Bedingungen wie in Abb.

verschiedenen Versuchstagen zusammengefaßt und in zwei Gruppen unterteilt (Abb.23A+B). Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus der in Tabelle 5 angegebenen Versuchsanzahl, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) und sind der Übersichtlichkeit halber als Halbbalken eingezeichnet. In beiden Abb. sind die Kontrollen mitdargestellt. Die in Abb. 23A gezeigten Substanzen waren alle in der Lage, nach 30 min die durch Arsen verursachte Hemmung der Gluconeogenese aufzuheben. Dabei zeigten alle Dithiole eine vergleichbare Wirkung. Auch der Bis(acetylthio)ester (BAPSA) erwies sich als wirksam. Dagegen besaßen die in Abb. 23B zusammengefaßten Verbindungen praktisch keine Antidotwirkung auf die gehemmte Gluconeogenese. Dazu gehörten die Monothiole, die Trithiocarbonate und die oxidierte Form von DMPS. Der dreifache molare Überschuß wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen im selben Labor durchgeführten Versuchsreihen gewählt. In Einzelversuchen (ohne Abb.) konnte gezeigt werden, daß im Falle von DMPS, DMSA und BAPSA prinzipiell derselbe Verlauf erhalten wurde, wenn As und Antidot in equimolaren Mengen eingesetzt wurde, wobei BAPSA trotz des geringeren Reinheitsgrades (ca. 75 %) tendenziell dem DMPS überlegen war (steilerer Anstieg nach Zugabe). Bei den Substanzen in Abb. 23 B konnte dagegen auch ein 6facher Überschuß den Kurvenverlauf nicht günstig beeinflussen.

Um die wirksamen Substanzen untereinander etwas genauer zu vergleichen, wurden in Abb.23A u. B jeweils Regressionsgeraden durch die 3 Datenpunkte vor und nach der Antidotzugabe gelegt und der Quotient aus den Steigungen der Geradenpaare gebildet. Der Kontroll-Quotient wurde aus den Steigungen der 0-Kontrolle (40-60 min) und der As-Kontrolle (10-30 min) gebildet (Tab.5).

	Anzahl der Versuche	m_A	m_E	Q_m
0-Kontrolle	13	6.607		4.17
As (30 μ M)	7	1.584		
BAL	4	2.021	6.914	3.42
BAPSA	13	1.970	6.528	3.31
DMSA	8	1.950	6.120	3.14
DMPS	11	1.889	5.642	2.99
DTMSA	4	1.979	2.377	1.20
DTMS	4	1.205	1.050	0.87
oxDMPS	4	1.583	1.350	0.85
Penicillamin	5	2.269	1.773	0.78
MESNa	3	2.034	1.528	0.75
2-Mercaptoethanol	2	1.988	1.448	0.73

Tab.5: Einfluß verschiedener Testsubstanzen auf die durch Arsen gehemmte Gluconeogenese in Rattennierentubuli: m_A Steigung der Regressionsgeraden für die in Abb. 23 A u. B gezeigten Daten vor Antidotzugabe ($t = 10 - 30$ min), m_E Steigung nach Antidotzugabe ($t = 40 - 60$ min), $Q_m = m_E / m_A$.

Die scheinbare Überlegenheit von BAL ist wegen der geringen Versuchszahl statistisch nicht signifikant. Die in-vitro Ergebnisse zeigen, daß die Wirksamkeit der neu dargestellten Verbindung BAPSA, die keine freien SH-Gruppen besitzt, im Vergleich nicht schlechter als die der bekannten Dithiole ist. Dies ist umso bemerkenswerter, als der tatsächliche Gehalt an BAPSA aufgrund des Anteils an O-acetyl-Ester deutlich unter der nominellen Einwaage lag. Gleichzeitig wurde deutlich, daß die Trithiokohlensäureester von DMPS und dem bislang in freier Form unbekannten Amid ebenso wenig zur Aufhebung der durch As_2O_3 verursachten Hemmung der Gluconeogenese imstande waren wie die niedermolekulare Fraktion der Oxidationsprodukte von DMPS.

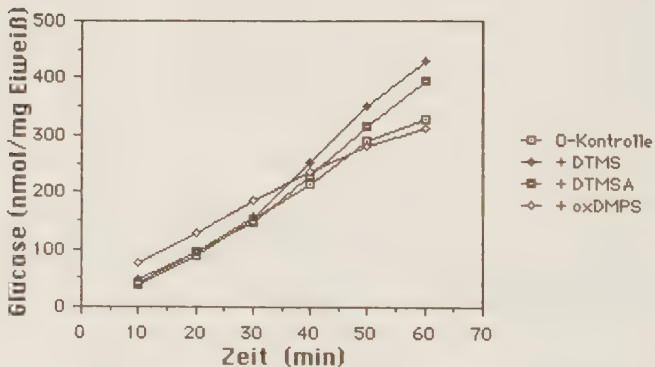


Abb.24: Einfluß von DTMS, DTMSA und ox(DMPS)_x auf die Gluconeogenese aus Pyruvat in isolierten Rattennierentubuli (Bedingungen wie in Abb. 23A, ohne Arsen, Zugabe der Testsubstanzen zu Beginn)

Daß die Unwirksamkeit dieser Substanzen nicht durch toxische Effekte verursacht wurde, legt der in Abb.24 gezeigte Kontrollversuch dar, in dem DTMS, DTMSA und ox(DMPS)_x ohne Arsen mit Tubuli inkubiert wurden.

Keine Antidotwirkung zeigte auch D-Penicillamin, das darin den anderen untersuchten Monothiolen MESNa und β -Mercaptoethanol glich, die sich von DMPS bzw. BAL nur durch das Fehlen einer Mercaptomethylengruppe unterscheiden. Diese Aussagen können aufgrund der niedrigen Versuchszahl jedoch nur mit Vorbehalt getroffen werden.

6.2 in vivo-Prüfung der Wirksamkeit an der NMRI-Maus

Durch einen in-vivo-Versuch sollte geprüft werden, inwieweit die in-vitro Ergebnisse im Tiermodell übertragbar waren. Dabei wurden nur die neu dargestellten Verbindungen, von denen eine (BAPSA) in vitro wirksam, die andere (DTMSA) jedoch unwirksam war, im Vergleich zu DMPS als Standard bei der Vergiftung mit As₂O₃ untersucht:

a) Versuchsdurchführung:

Vierzig äußerlich unauffällige NMRI-Mäuse wurden zu Gruppen à 10 Tieren in große Käfige mit Standard-Preßfuttermischung und aqua ad lib. gesetzt. Die Tiergewichte lagen zu Versuchsbeginn zwischen 28 und 33 g. Jeder Maus wurden zunächst 20 mg As₂O₃/kg KG (≈ 0.2 mmol As/kg) als 34 mM As₂O₃ Lsg. subcutan über dem linken Femur injiziert.

Dieser Wert wurde einer Dosis-Wirkungs-Kurve entlehnt, die im selben Labor aufgestellt worden war, und stellt die LD 25 für die subcutane Vergiftung mit As_2O_3 dar, wenn nach 30 min DMPS als Antidot in einer Dosierung von 0.7 mmol/kg i.p. gegeben wird. (Für die unbehandelte Maus wurde die LD 99 mit ≈ 13 mg As_2O_3 /kg bestimmt.)

Nach 30 min erhielten die Behandlungsgruppen jeweils eine einmalige Gabe von 0.7 mmol Antidot/kg KG i.p. Die Substanzen DMPS, BAPSA und DTMSA wurden als 22 mM Stammlösungen mit 15 % Ethanol in physiol. Kochsalzlösung am Versuchstag frisch zubereitet. Der SH-Gehalt lag bei der DMPS-Lsg. >90 % (Ellman's Reagenz), bei BAPSA und DTMSA erwartungsgemäß unter 5 % bzw. 2 % (Nachweisgrenze). Die Kontrollgruppe erhielt ein entsprechendes Volumen der wirkstofffreien, isotonen NaCl-Lsg. mit 15 % (v/v) Ethanol (d.h. je nach Gewicht 0.75 - 1.1 ml i.p.).

b) Ergebnisse:

Die Absterbekurve zeigt Abb. 25. Dabei ist die Kontrollgruppe der besseren Übersichtlichkeit halber weggelassen, da hier bereits 3 h nach Versuchsbeginn alle Tiere tot waren.

Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Antidotgabe bereits stark angeschlagen. Sie waren teils apathisch mit deutlich sichtbarer Diarrhoe, teils zeigten sie motorische Störungen und krampften. Nach Antidotgabe erhielten sich die mit BAPSA behandelten Tiere deutlich schneller als die DMPS-Gruppe, wobei jedoch die neurologischen Symptome bei den auffälligen Tieren beider Gruppen (in abgeschwächter Form) weiterhin beobachtet wurden. Die mit DTMSA behandelte Gruppe zeigte keinerlei Besserung, und alle Tiere waren 6 h nach Versuchsbeginn tot. Zu die-

sem Zeitpunkt wurde bei der BAPSA-Gruppe bereits eine deutliche Lebhaftigkeit bei einigen Tieren registriert, d.h. sie suchten Futter und Wasser auf, während in der DMPS-Gruppe bereits 2 Tiere tot waren und der Rest auf einem Haufen zusammenhockte. Keine weitere Erholung zeigten jene Tiere, die zuvor mit Krampferscheinungen präsentierten (BAPSA-Gruppe: 2, DMPS-Gruppe: 1 Tier). Etwa 24 h nach Versuchsbeginn lebten in der BAPSA-Gruppe noch alle Tiere, verglichen mit 7 Überlebenden der DMPS-Gruppe. 18 h später war die Zahl der Überlebenden jedoch in beiden Gruppen gleich (7), und im Verhalten der Tiere waren keine Unterschiede oder Auffälligkeiten mehr erkennbar.

Die Tiere blieben auch in der nachfolgenden Beobachtungsphase von 28 Tagen unauffällig und zeigten eine gleichmäßige Gewichtszunahme. Beim Vergleich der beiden Gruppen ist zu beachten, daß aufgrund des geringeren Wirkstoffgehaltes der BAPSA-Lsg., die über 20 % O-acetyl-Reste enthielt, ein dennoch annähernd gleiches Resultat der Überlebensrate mit einem Verzögerungseffekt in der BAPSA-Gruppe erhalten wurde, während für DTMSA in Übereinstimmung mit den in-vitro Versuchen keine Wirksamkeit nachweisbar war.

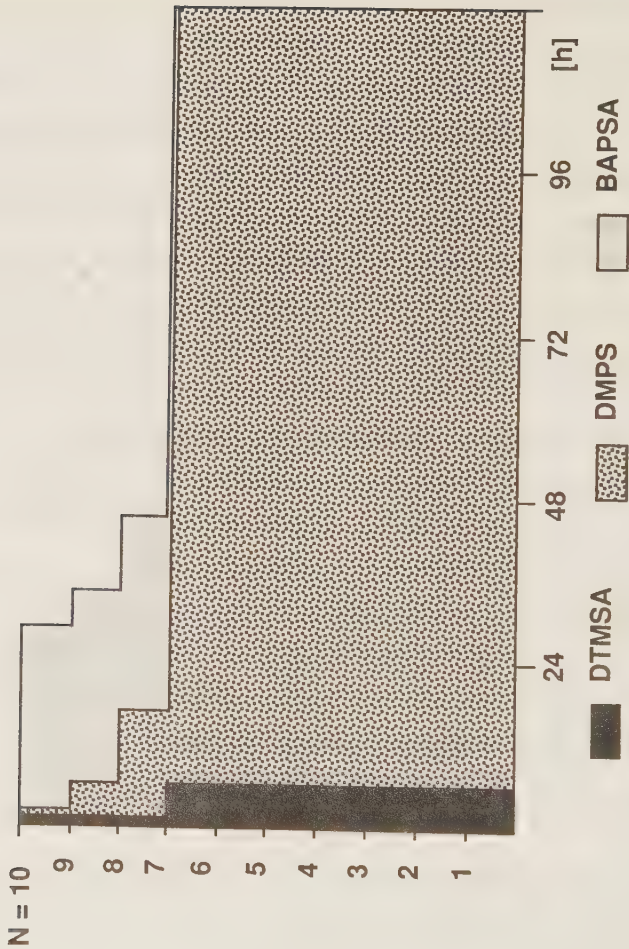


Abb. 25: Absterbekurve für verschiedene Antidote gegen Arsenik. Je 10 NMRI-Mäuse erhielten 0.2 mmol As / kg s.c. Nach 30 min wurden 0.7 mmol / kg Antidot i.p. gegeben. Die Kontrollgruppe war nach 3 h tot (ohne Abb.)

7. Akute Toxizität von BAPSA

Nachdem BAPSA *in vitro* und *in vivo* eine deutlich sichtbare Wirkung bei der Arsenikvergiftung gezeigt hatte, wurde für diese Substanz ein Versuch zur Abschätzung der akuten Toxizität unternommen. Dabei genügte in diesem Rahmen eine orientierende Bestimmung der LD 50, da zum einen sich die Substanz bereits bei mittlerer Dosierung (< 190 mg/kg) als wirksam erwiesen hatte, zum anderen infolge der noch unzulänglichen chemischen Reinheit der in Gramm-Mengen verfügbaren Substanz eine genauere Bestimmung wenig sinnvoll erschien.

a) Versuchsdurchführung:

Aufgrund der Notwendigkeit, bei stärker konzentrierten, wässrigen Lösungen einen Lösungsvermittler einzusetzen, wurden in einem Vorversuch Lösungen mit DMSO (5%) bzw. Carboxymethylcellulose (1%) in physiol. NaCl-Lösung ausprobiert. Für den Hauptversuch wurde 1.0 g BAPSA in 1.0 ml EtOH abs. gelöst und auf 10 ml mit NaCl-Lsg. aufgefüllt, da der Einfluß von DMSO bzw. CMC auf die chemische Stabilität von BAPSA sowie auf den Verlauf der Arsenikvergiftung zuvor nicht ausreichend untersucht worden war. Alle drei Lösungen zeigten eine fein disperse, milchige Trübung, aus der jedoch auch nach 2 h bei RT kein Niederschlag ausfiel.

Zwölf unauffällige, männl. NMRI-Mäuse wurden in Dreier-Gruppen getrennt mit Standard-Preßfuttermischung und aqua ad lib. Die Tiergewichte lagen zwischen 24 und 27 g. Jedes Tier erhielt eine einmalige Gabe einer vorausberechneten Menge der ethanolischen BAPSA-Lsg. *i.p.* und wurde täglich inspiziert.

b) Ergebnisse:

Die Verträglichkeit hoher Dosen von BAPSA über einen 6-tägigen Beobachtungszeitraum zeigt Tab.6.

i.p. Dosis	1.	2.	3.	4.	5.	6. Tag
400 mg/kg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
1000 mg/kg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
2000 mg/kg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4000 mg/kg	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Tab. 6: orientierende Bestimmung der akuten Toxizität für BAPSA bei NMRI-Mäusen. Je 3 Tiere erhielten die angegebene Dosis in max. 1.0 ml physiol. NaCl (+10% EtOH) i.p. Angegeben ist jeweils die Fraktion überlebender Tiere.

Bei den Tieren der Gruppe mit 4000 mg/kg trat der Tod innerhalb der ersten 48 h ein. Auch bei der Gruppe mit 2000 mg/kg waren deutliche Anzeichen einer Intoxikation sichtbar: die Tiere zeigten einen Aktivitätsverlust bereits wenige Stunden nach der Applikation, nahmen im Verlaufe des ersten Tages praktisch keine Nahrung auf, lagen stundenlang mit abgespreizten Extremitäten und schnappender Atmung auf dem Bauch, wobei sie auf Berührung kaum reagierten. Sie erholten sich

jedoch im Laufe der nächsten 12 h zusehends und waren am 3. Tag völlig unauffällig. Ähnlich fielen auch die Vorversuche mit DMSO- bzw. CMC-haltigen Lösungen aus (bei CMC in der Gruppe mit 2000 mg/kg nach 6 Tagen 2/3). Entsprechend den in Tab.6 gezeigten Ergebnissen ist die LD 50 für die akute Toxizität von BAPSA zwischen 2000 und 4000 mg/kg einzustufen, entsprechend 6 - 14 mmol/kg (vgl. dazu die Werte von DMPS und DMSA in Tab. 2).

D Diskussion

Mit BAPSA (= 2,3-Bis(acetylthio)propansulfonat) wurde eine neue Substanz synthetisiert, die bislang in der chemischen Literatur nicht beschrieben ist und eine gute Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* bei der Arsenikvergiftung besitzt. BAPSA besitzt eine Reihe von interessanten Eigenschaften im Vergleich zu anderen, herkömmlichen Antidoten gegen Arsenik:

- a) BAPSA ist ein aliphatisches Sulfonamid und der erste Vertreter dieser Substanzklasse unter den Antidoten gegen Arsenik;
- b) BAPSA besitzt eine geringe akute Toxizität bei hoher Lipidlöslichkeit; es stellt somit ein Bindeglied dar zwischen dem BAL-Typ (gute Lipidlöslichkeit - ungünstige Toxizität) und dem DMPS-Typ (geringe Lipidlöslichkeit - günstige Toxizität);
- c) BAPSA besitzt in seiner Darreichungsform keine freien SH-Gruppen.

Der letzte Punkt legt nahe, daß es sich bei BAPSA um ein "Pro-Drug" handelt, das nach seiner Applikation erst in die Wirkform überführt wird. Die Evidenz dafür ist bislang indirekt:

- a) wirksame Antidote gegen Arsen besitzen eine Dithiolgruppierung, die bei BAPSA in Form des Bis(acetyl)thioesters vorgebildet ist;
- b) Thioester sind leicht spaltbare Verbindungen, die bei der Hydrolyse Thiole und Carboxylate ergeben;
- c) alkylierte (Thioether) oder oxidierte Thioverbindungen (Disulfide, Sulfoxide etc.) sind bei der Arsenvergiftung wenig oder gar nicht wirksam.

Durch Esterspaltung würde BAPSA in das in reiner Form bislang unbekannte 2,3-Dimercaptopropansulfonamid (DMPSA) umgewandelt. Ob dies unter den Versuchsbedingungen enzymatisch (z.B. durch unspezifische Esterasen) oder nicht-enzymatisch erfolgt, ist bislang ungeklärt. Wenn auch freies DMPSA nicht direkt erhalten werden konnte, ist trotzdem denkbar, daß infolge der Ringbildung mit Arsen diese an sich labile Struktur stabilisiert würde. Dieses Verhalten ist in anderen Fällen von Ba^{2+} -Mercaptiden berichtet worden (JOHARY 1955b).

Das Pro-Drug-Konzept ist im Bereich der Thiolverbindungen nicht neu: Cystein ist als Thiazolidin-Derivat, das nicht-enzymatisch in Cystein und Acetaldehyd (!) gespalten wird, bereits mit Erfolg als hepatoprotektive Substanz bei der Acetaminophen-induzierten Leberschädigung eingesetzt worden (NAGASAWA 1982). Aus BAPSA entstehen bei der Hydrolyse 2 Mol Acetat. Inwieweit dadurch die bei Dithiol-Gabe beobachtete Lactacidose kompliziert wird (DURLACHER 1946; MODELL 1946), ist ungeklärt.

Überraschend ist, daß Acetylthioester offenbar für einen therapeutischen Einsatz als Antidote keine Rolle spielen, obwohl sie eine häufig benutzte Vorstufe bei der Darstellung von (Di)thiolen sind, die eine Reihe der bei freien Dithiolen beobachteten Reaktionen (z.B. Disulfidbildung) nicht geben. Möglicherweise haben hier die Mitteilungen von Owen u. Mitarbeitern ein intensiveres Studium verhindert, die für peracetylierte BAL-Analoga im Tierversuch keine Wirkung gesehen haben (EVANS 1949b). Außer Thioestern sind auch Benzylreste und (Thio)-Ketone als Schutzgruppen für SH-Reste eingesetzt worden (PAVLIC 1949; JOHARY 1955c; IQBAL 1960). Über eine in-vivo Wirksamkeit dieser Substanzen wurde dabei nicht berichtet. Dies deutet daraufhin, daß nicht jede Schutzgruppe für eine Prodrug-Synthese geeignet ist. Als weitere Bestätigung dieser Annahme wird hier das Beispiel des 1,3-

Dithiolan-2-thion-4-methylsulfonamids vorgeführt, über dessen chemische Darstellung hier ebenfalls erstmals berichtet wird. Diese Substanz, die formal als Diester der Trithiokohlensäure aufzufassen ist, zeigte im in-vitro und in-vivo System praktisch keine Wirkung gegen Arsenik. Bei ihrer Spaltung, die chemisch nur unter drastischen Bedingungen abläuft, würde neben dem Dithiol Thiocarbonat entstehen, das jedoch instabil gegen den Zerfall in H_2O und Carbonylsulfid ist.

Es liegt nahe, energetische Gründe für diese Unterschiede im Verhalten anzuführen: während bei BAPSA aus der labilen Thioester-Bindung durch Ringbildung mit Arsen eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt, ist bei DTMSA der Fünfring bereits vorhanden, und die Destabilisierung bei seiner Spaltung würde schwerlich durch eine Ringbildung mit Arsen kompensiert werden. Die Gründe für die Instabilität des freien DMPSA sind nicht bekannt. Während im Falle von 2,3-Dimercaptopropionamid (DMPA), dessen Darstellungsversuche ebenfalls mißlingen, möglicherweise konkurrierende Eliminationsreaktionen (z.B. Dehalogenierung, Desulfurierung, Episulfidbildung etc.) unter Wiederherstellung der zur Carbamidgruppe in Konjugation stehenden Doppelbindung oder unter Polymerisation die Reindarstellung verhindert haben könnten, ist ein solches Verhalten im Falle von DMPSA weniger leicht ersichtlich. Es wurde behauptet, daß die freie 2,3-Dimercaptopropansulfonsäure ebenso wie ihr Ethylester mit Thiolgruppen das γ -Thiosulton bildet (JOHARY 1955d), doch ist ein solches Verhalten für Amide nicht erwähnt.

Die beträchtliche Reaktivität dieses Systems dürfte auch als Hauptursache für die aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Reindarstellung angesehen werden. Hinzu kommen die mangelnde Kristallisationsneigung, die häufig bei racemischen Gemischen beobachtet wird, und die Bildung von O-acetylestern, die durch Zersetzung des eingesetzten Thioacetats

hervorgerufen wird und im präparativen Maßstab praktisch nur durch Kristallisation zu beseitigen ist (EVANS 1949a). (O-acetylesther werden aufgrund der vergleichsweise geringeren Nukleophilie als unwirksam bei der Arsenikvergiftung angesehen, obwohl diese Annahme für gemischte S/O-acetylesther experimentell bislang nicht überprüft wurde.) Dies würde der Reinsubstanz weitere Vorteile in Aussicht stellen. Die beobachtete Verzögerung bei der Letalität im Vergleich zu DMPS (vgl. Abschn. 7) könnte dahingehend interpretiert werden, daß BAPSA in diesem System zwar eine bessere Bioverfügbarkeit besitzt, die jedoch aufgrund der geringeren wirksamen Stoffmenge und/oder der rascheren Inaktivierung (z.B. durch Disulfidbildung) nicht entscheidend zum Tragen kam. Quantitative Untersuchungen zur Mobilisation und Ausscheidung sind mit BAPSA bislang nicht durchgeführt worden.

Die Inaktivierung von Dithiolen durch Disulfidbildung ist ein wichtiger Aspekt der Pharmakokinetik dieser Substanzen. Die Oxidationsprodukte des DMPS waren bei den hier berichteten in-vitro Versuchen mit Arsen unwirksam. Das Unvermögen, $\text{ox}(\text{DMPS})_x$ in-vitro wieder zu regenerieren, kann seine Ursache einmal in der Depletion von Reduktionsequivalenten haben, die durch die Stoffwechselblockade aufgebraucht wurden. Zum andern könnte die beträchtliche Molekülgröße der Disulfide und ihr Polyanionencharakter eine Aufnahme in die Zelle verhindert haben, so daß die Reduktionsmechanismen nicht effektiv werden konnten. Da durch chromatografische Untersuchungen außerdem ein rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen nieder- und hochmolekularen Polymeren nahegelegt wurde, ist eine echte Analogie zum MESNa kaum herzustellen. Es bleibt in diesem Zusammenhang unklar, weshalb bei pharmakokinetischen Untersuchungen mit radiomarkiertem DMPS nur ein "bedeutsames" Nebenprodukt in der DC-Analyse auftrat

(LUGANSKII 1960). Demgegenüber wurde bei Untersuchungen mit markiertem 1,3-Dimercaptopropansulfonat eine Vielzahl radioaktiver Fraktionen im Urin gefunden (GABARD 1979).

Ebenfalls als unwirksam erwies sich im in-vitro System D-Penicillamin. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung einer vic-Dithiolgruppierung für die Bindung von Arsen. Die Behauptungen anderer Untersucher über den therapeutischen Nutzen konnten somit nicht bestätigt werden.

Die Inaktivierung von Dithiolen durch Oxidation ist in Bezug auf ihre Bedeutung unter in-vivo Bedingungen immer noch schlecht verstanden. Obwohl außer Zweifel steht, daß Dithiole in Gegenwart einiger Metalle beschleunigt inaktiviert werden, besteht über das Ausmaß dieser Reaktion geringe Klarheit. Zu den Acceleratoren dieses Vorgangs gehören Fe und Cu, die beide im Körper in komplex-gebundener Form vorkommen (BARRON 1947a). Durch diese Komplexbindung sind sie möglicherweise als Oxidantien weniger effektiv als in "freier" Form, da für den Mechanismus der Dithioloxidation ein Valenzwechsel ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$; $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^{1+}$) diskutiert wird (der im Falle von Cu^{2+} auch nachgewiesen wurde! - vgl. dazu KLOTZ 1958). Außerdem muß mit einer Wechselwirkung mit zellulären Redoxsystemen gerechnet werden, die zur Bildung gemischter Disulfide mit Cysteinresten, Glutathion etc. führen würde. Dies könnte eine Ursache der hohen Plasmaeiweißbindung von DMPS sein (WIEDEMANN 1982).

Andererseits ist denkbar, daß die Stabilität bestimmter Metall-Dithiol-Komplexe eine Oxidation erschweren könnte. Im Lichte dieser Überlegungen müssen auch die Untersuchungen zur kinetischen Stabilität verschiedener Metallkomplexe von DMPS und DMSA gesehen werden. Das untersuchte Reaktionsmodell mit CS_2 als Elektrophil gibt Anlaß zu der Annahme, daß die Metallsulfidbildung die treibende Kraft

dieser Reaktion allein nicht sein kann. Überraschend war nämlich die prompte Reaktion der Bleiverbindung im Gegensatz zur Beständigkeit des Cd-Komplexes sowohl bei DMPS als auch bei DMSA. Diese trotz der unterschiedlichen Strukturen (DMSA enthält mit seinen zwei Carboxylgruppen noch weitere (chelat-)komplexbildende Funktionen!) beobachtete Ähnlichkeit läßt vermuten, daß die Stabilität der Mercaptide von entscheidender Bedeutung für die Reaktivität gegenüber CS_2 ist, was eine geringe Stabilität der Pb-Addukte impliziert. (In Übereinstimmung damit ist der Einsatz von vic-Dithiolen bei der Bleivergiftung umstritten (MEYERS 1980) bzw. kontraindiziert (HENSCHLER 1983).) Die herausragende Stabilität der Cd-Komplexe wurde bereits von anderen Autoren beobachtet (Lit. bei APOSHIAN 1983). Eine alternative Erklärung für das Ausbleiben der Trithiocarbonatbildung könnte auch die bei steigendem pH beschleunigte Oxidation der Dithiole sein. Es wurde nicht eingehend untersucht, ob auch Disulfide in gleicher Weise mit CS_2 reagieren können wie Thiole. Eine geringere Reaktivität der Disulfide, die infolge der beschleunigten Oxidation des Metall-Dithiol-Komplexes entstanden sein könnten, hätte ebenfalls ein Ausbleiben der Indikatorfarbe zur Folge. Experimentell ergaben sich dafür jedoch keine Anhaltspunkte, so daß angenommen wird, daß der steigende pH-Wert, d.h. Anstieg von $[\text{OH}]^-$, zu einer zunehmenden Polarisierung der Metall-Thiol-Bindung führt, die die Addition an CS_2 erleichtert und somit die kinetische Stabilität des Metallkomplexes reflektiert. Für DMSA konnte das Trithiocarbonat aus wässriger Lösung nicht isoliert werden (vgl. die Situation für DMPA, Abschn. 5.1.2). Die Ursache für diesen Unterschied zu DMPS ist nicht bekannt.

E Materialien und Methoden

a) Geräte und Analysen:

Schmelzpunktsbestimmungen:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einer Apparatur nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi, Flawil, Schweiz). Die Schmelzpunkte wurden nicht korrigiert.

Elementanalysen:

Die Bestimmung der Elementanalysen erfolgte im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz, Kronach.

Molgewichtsbestimmungen:

Die Bestimmung des Molekulargewichts der niedermolekularen Fraktion von $\text{ox}(\text{DMPS})_x$ (Abschn. 5.3.2) wurde von Herrn Dr. R. Pasch, anorg.-chem. Institut der Universität Köln, kryoskopisch ausgeführt.

^1H -NMR-Spektroskopie:

Die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren erfolgte mit einem T-60 NMR-Spektrometer (60 MHz) der Firma Varian, Darmstadt. Deuterierte Lösungsmittel (CDCl_3 , d_6 -DMSO, CD_3OD) und interne Standards (TMS, 2,2-Dimethyl-2-sila-pentansulfonat) wurden von der Fa. Aldrich, Steinheim bezogen.

Das 200 MHz-Spektrum von DTMS (Abschn. 5.3.3) besorgte Herr Dr. D. Wildenauer, München.

Refraktometer:

Die Bestimmung des Brechungsindex wurde mit einem thermostatisierten Abbe-Refraktometer (Fa. Zeiss, Oberkochen) ausgeführt.

Gefriertrocknung:

Für die Gefriertrocknungen stand eine Lyophilisationsapparatur "Delta I a" der Fa. Christ, Osterode, zu Verfügung.

UV-Photometer:

Die Registrierung der Säulenchromatogramme erfolgte mit einem Uvi-cord "S" Photometer bei 206 nm und einem Schreiber 2210 (Fa. LKB, Bromma, Schweden).

HPLC:

Für die HPLC-Analysen stand eine Anlage der Fa. GynkoteK, München mit Pumpe (Modell 600/200), Injektor und UV-Detektor SP 4 (210 nm) zur Verfügung. Von derselben Firma wurde auch die HPLC-Säule (OSD Shandon "Hypersil" 5 μ , RP 18, 250 mm) bezogen. Ein Fraktionssammler (Typ 2111 Multirac) stammte von LKB, Bromma, Schweden und der Integrator C-R1B von Shimadzu, Kyoto, Japan.

Photometrie:

Die Extinktionsmessungen (Abschn. 5.4.2) wurden auf einem Spektralphotometer PMQ 3 mit Spaltautomatik (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 412 bzw. 546 nm ausgeführt.

Thermoschüttler:

Die Inkubationen der in vitro-Ansätze (Abschn. 6.1) erfolgten in einem "Aquatherm"-Wasserbadschüttler (Fa. New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA)

Für "trockene" Inkubationen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen stand ein Rotationsmischer 3300 der Fa. Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz, Hamburg, zur Verfügung.

Zentrifugen:

Für präparative Zentrifugationen stand eine kühlbare Laborzentrifuge (Minifuge GL) mit Schwingrotor (Fa. Heraeus-Christ, Osterode) zur Verfügung.

Kleine Ansätze wurden in einer Centrifuge 5414 (Fa. Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz, Hamburg) ausgeführt.

pH-Messungen:

Die Messung des pH-Wertes erfolgt mit einem Präzisions-pH-Meter (Fa. Knick, Berlin)

Lichtmikroskopie:

Die Vitalität der eingesetzten Nierentubuli wurde mit der Farbstoff-Ausschluß-Methode unter einem Lichtmikroskop IM 35 bei 320facher Vergrößerung im Phasenkontrast (Fa. Zeiss, Oberkochen) geprüft.

Fotografie:

Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer Olympus OM 2 Kamera (Fa. Olympus, Hamburg) auf einem Agfapan 25 S/W-Film (Fa. Agfa-Gevaert, München) aufgenommen.

b) Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten zur Organentnahme wurden bei der Süddeutschen Versuchstierfarm, Tuttlingen bezogen. Vom selben Lieferanten stammten auch die männlichen NMRI-Mäuse für die pharmakologischen Prüfungen. Die Tiere erhielten Standardpreßfutter, Mischung R (Fa. altromin, Lage/Lippe) und aqua ad lib.

c) Chemikalien und Reagenzien:

Alle Chemikalien und Lösungsmittel, soweit nicht anders angezeigt, stammten von der Fa. Merck, Darmstadt, und waren p.a. Qualität oder reinst.

Pharmaka:

Zur Anästhesie der Versuchstiere wurde Nembutal-Injektionslösung (= 60 mg Pentobarbital/ml) (Fa. CEVA, Bad Segeberg) eingesetzt, zur Gerinnungshemmung diente Heparin-Natrium-Injektionslösung 25000 I.E./5 ml (Fa. Braun, Melsungen).

Arsen:

di-Arsen-trioxid (suprapur[®], Fa. Merck, Darmstadt) wurde bei 80 °C in physiol. Kochsalzlösung gelöst und nach Abkühlen auf eine definierte Konzentration eingestellt.

Antidote:

BAL, D-Penicillamin und 2-Mercaptoethanol wurden von Serva, Heidelberg bezogen; MESNa bei Sigma, München, und DMSA bei EGA-Chemie, Steinheim, erworben.

DMPS war ein Geschenk der Fa. Heyl, Berlin.

Synthesestoffe:

Allylbromid pro synthesisi wurde von Merck, Darmstadt, geliefert; Kaliumthioacetat purum von Fluka, Neu-Ulm, bzw. Aldrich, Steinheim.

Enzyme:

Collagenase, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase lieferte Fa. Boehringer, Mannheim.

Biochemikalien:

Rinderserumalbumin (Fa. Serva, Heidelberg)

Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)

Adenosin-5'-triphosphat- Na_2 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat- Na_2 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Titersubstanzen:

Für die Jodometrie wurden KIO_3 -Urtitersubstanz (1 mM in H_2O dest.) (Merck, Darmstadt) und 1%ige Stärkelösung zur Anzeige des Umschlagpunkts, für die photometrische SH-Gruppen-Bestimmung Ellman's Reagenz [= 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)] (10 mM in H_2O dest. + NaHCO_3 bis zur vollständigen Lösung) (Fa. Sigma, München) eingesetzt.

Biuret-Reagenz:

Für die Eiweißbestimmung nach der Biuret-Methode wurde das Reagenz wie folgt zusammengestellt (BEISENHERZ 1953):

1.5 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
4.5 g	K, Na-Tartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
4.0 g	NaOH
2.5 g	KJ
H_2O dest. ad 500 ml	

Die Standardisierung erfolgte mit Rinderserumalbumin (Fa. Serva, Heidelberg) und war im Bereich von 2.5 - 30.0 mg/ml linear.

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) (DUL-BECCO 1954):

Einwaage:	8.00 g	NaCl
	0.20 g	KCl
	1.15 g	Na_2HPO_4
	0.20 g	KH_2PO_4

mit 0.1 N HCl auf pH 7.0 eingestellt und auf 1000 ml mit H_2O dest. aufgefüllt.

Krebs-Henseleit-Puffer:

Für die Versuche mit Nierentubulizellen wurde eine gepufferte Salzlösung nach Krebs und Henseleit jeweils am Versuchstag frisch angesetzt (KREBS 1932):

Einwaage:	13.840 g	NaCl
	0.324 g	KH ₂ PO ₄
	0.706 g	KCl
	0.588 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	0.770 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	4.200 g	NaHCO ₃

gelöst in 2000 ml H₂O dest. und 10 min mit Carbogen begast.

Glucose-Puffer:

Für die enzymatische Glucosebestimmung mit Hexokinase/Gluc-6-P-Dehydrogenase wurde folgendes Puffergemisch zusammengestellt (BERGMEYER 1974):

Einwaage:	1.8565 g	Triethanolamin · HCl
	0.3253 g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
	0.3723 g	EDTANa ₂ · 2 H ₂ O
	0.1210 g	ATPNa ₂ · 4 H ₂ O
	0.1575 g	NADPNa ₂

mit HCl auf pH 7.6 eingestellt und auf 100 ml mit H₂O dest. aufgefüllt.

Farbstoffe:

Zur Vitalitätsprüfung der Tubuli wurde eine 0.5 %ige Trypan-Blau-Lösung (Fa. seromed, Berlin) benutzt.

Chromatografika:

Die Gelchromatografie wurde an Bio-Gel P2 (Fa. Biorad, München) ausgeführt. Als Eluent diente NH₄⁺-Formiat-Puffer (50 mM, pH 6.5, entgast).

Für die HPLC wurde ein Laufmittel aus KH_2PO_4 -Puffer (10 mM, pH 2.5) und Acetonitril (9 Teile + 1 Teil) hergestellt und schonend entgast.

Laborgase:

Die techn. Gase (N_2 , Carbogen, CO_2) wurden von Fa. Linde, München, die Synthesegase (H_2S , NH_3) von Fa. Merck, Darmstadt, geliefert.

F Literaturverzeichnis

Bei **Übersichtsartikeln** sind die Autorennamen in **Fettdruck** aufgeführt.

AASETH J. (1983)

"Recent advance in the therapy of metal poisonings with chelating agents."

Human Toxicol. **2**, 257 - 72

ANKE M., GRUN M., PARTSHEFELD M. (1977)

"The essentiality of arsenic for animals."

in: HEMPHILL D.D. (ed.), "Trace Substances in Environmental Health", X. Proceedings of University of Missouri's 10th Annual Conference on Trace Substances in Environmental Health, University of Missouri, Columbia

APEL M., STOPPLER M. (1983)

"Speciation of arsenic in urine of occupationally non-exposed persons."

4th Int. Conf. Heavy Metals in the environment, Heidelberg,

CEP Consultants ltd., Edinburgh, 1983, **1**, 517 - 20

APOSHIAN H.V. (1983)

"DMSA and DMPS - water soluble antidotes for heavy metal poisoning."

Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. **23**, 193 - 215

APOSHIAN H.V., CARTER D.E., HOOVER T.D., HSU C., MAIORINO R.M., STINE E. (1984)

"DMSA, DMPS and DMPA* - as arsenic antidotes."

Fundam. Appl. Toxicol. **4**, S 58 - S 70

APOSHIAN H.V., MAIORINO R.M., WEBER G.L., APOSHIAN M.M., MC KELVIE D.H., WILSON S.E. (1986)

"Water soluble dithiol metal binding agents - efficacies and biotransformation."

Acta Pharm. Tox. **59** (Suppl. VII), 467 - 70

AXELSON O., DAHLGREN E., JANSSON C.D., REHNLUND S.O. (1978)

* nicht identisch mit α,β -Dimercaptopropionamid (vgl. Abschn. 5.1), daher im vorliegenden Text mit DMPPA bezeichnet (vgl. Tab. 2).

"Arsenic exposure and mortality: a case-referent study from a Swedish copper smelter."

Brit. J. Ind. Med. **35**, 8 - 15

BAKER M.L., DALRYMPLE G.V., SANDERS J.L., MOSS A.J. JR. (1970)
"Effects of radiation on asynchronous and synchronized L cells under energy deprivation."

Radiat. Res. **42**, 320 - 30

BARRIT G.J., ZANDER G.L., UTTER N.F. (1976)

"The regulation of pyruvate carboxylase activity in gluconeogenic tissues."

in: HANSON R.W., MEHLMAN M.A. (eds.), "Gluconeogenesis"
J. Wiley & Sons, New York, 1976

BARRON E.S.G., BAKER MILLER Z., KALNITSKY G. (1947a)

"The oxidation of dithiols."

Biochem. J. **41**, 62 - 8

BARRON E.S.G., BAKER MILLER Z., BARTLETT G.R., MEYER J.,
SINGER T.P. (1947b)

"Reactivation by dithiols of enzymes inhibited by Lewisite."

Biochem. J. **41**, 69 - 74

BASINGER M.A., CASAS J.S., JONES M.M., WEAVER A.D., WEINSTEIN
N.H. (1981a)

"Structural requirements for Hg(II) antidotes."

J. Inorg. Nucl. Chem. **43**, 1419 - 25

BASINGER M.A., JONES M.M., SHINOBU L.A. (1981b)

"Structural requirements for chelate antidotes for acute cadmium intoxication."

J. Inorg. Nucl. Chem. **43**, 3039 - 42

BEISENHERZ G., BOLTZE H.J., BÜCHER T., CZOK R., GARBADE K.H.,
MEYER-ARENDT E., PFLEIDERER G. (1953)

"Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase,
Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und
Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang."

Z. Naturforsch. **8 B**, 555 - 77

BELOUS M.A., POSTOVSKII I.YA. (1950)

"Pseudoallicin."

ZHUR. OBSHCHEI KHIM. **20**, 1701 - 10

hier zitiert nach: Chem. Abstracts **45**, 2391 - 2 (1951)

- BENCKO V., BENES B., CIKRT M. (1976)
 "Biotransformation of As(III) to As(V) and arsenic tolerance."
 Arch. Toxicol. **36**, 159 - 62
- BERGMAYER H.U., BERNT E., SCHMIDT F., STORK H. (1974)
 "D-Glucose."
 in: BERGMAYER H.U. (Hrg.) "Methoden der enzymatischen Analyse" ,
 3. Aufl., 1241 - 6
 Verlag Chemie, Weinheim, 1974
- BLEJER H.P., WAGNER W. (1976)
 "Inorganic arsenic - ambient level approach to the control of
 occupational cancerogenic exposures."
 Ann. N.Y. Acad. Sci. **271**, 179 - 86
- BLOCK E., BAZZI A.A., REVELLE L.K. (1980)
 "Dimer of the onion lachrymatory factor: the first stable 1,2-dithietane
 derivative."
 J. Amer. Chem. Soc. **102**, 2490 -1
- BRAUN H.A., LEHMAN M.L., CALVERY H.O. (1946)
 "The efficacy of 2,3-dimercaptopropanol (BAL) in the therapy of
 poisoning by compounds of antimony, bismuth, chromium, mercury and
 nickel."
 J. Pharmacol. Exp. Ther. (Suppl.) **87**, 119 -25
- BRAY G.A. (1974)
 "Nutritional factors in disease."
 in: SODEMAN W.A., SODEMAN W.A. jr. (eds.) "Pathologic physiology",
 5th ed., 839 - 64
 Saunders, Philadelphia, 1974
- BUCHET J.P., LAUWERYS R., ROELS H. (1981a)
 "Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a
 single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate and
 dimethylarsinate in man."
 Int. Arch. Occup. Environ. Health **48**, 71 - 9
- BUCHET J.P., LAUWERYS R., ROELS H. (1981b)
 "Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after
 repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers."
 Int. Arch. Occup. Environ. Health **48**, 111 - 8
- BUMP E.A., JACOBS G.P., LEE W.W., BROWN J.M. (1986)
 "Radiosensitization by diamide analogs and arsenicals."
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **12**, 1533 - 5

BUNSEN R.W., BERTHOLD A.A. (1834)

"Das Eisenoxydhydrat, ein Gegengift der arsenigen Säure."

Verlag der Dieterich'schen Buchhandlung, Göttingen, 1834

BUTZENGEIGER K.H. (1949)

"Über die chronische Arsenvergiftung. 1) EKG-Veränderungen und andere Erscheinungen am Herzen und Gefäßsystem. 2)

Schleimhautsymptome und Pathogenese."

Dtsch. Arch. Klin. Med. **194**, 1 - 16

BYRON W.R., BIERBOWER G.W., BROUWER J.B., HANSEN W.H. (1967)

"Pathologic changes in rats and dogs from two-year feeding of sodium arsenite and sodium arsenate."

Toxicol. Appl. Pharmacol. **10**, 132 - 47

CALTABIANO M.M., KOESTLER T.P., POSTE G., GREIG R.G. (1986)

"Induction of 32- and 34-kDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents."

J. Biol. Chem. **261**, 13381 - 6

CANNON J.R., EDMONDS J.S., FRANCESCONI K.A., LANGSFORD J.B. (1979)

"Arsenic in marine fauna."

in: Proceedings of the 2nd International Conference on Heavy Metals in the Environment, London, Sept. 1979, 283 - 6

CEP Consultants Ltd., Edinburgh 1979

CHEN B., BURT C.T., GOERING P.L., FOWLER B.A., LONDON R.E. (1986)

"In vivo ³¹P-NMR studies of arsenite-induced changes in hepatic phosphate level."

Biochem. Biophys. Res. Comm. **139**, 228 - 34

COTTON F.A., WILKINSON G. (1974)

"Anorganische Chemie", 3. Aufl. (deutsch), übers. v. FRITZ H.P., Verlag Chemie, Weinheim, 1974

CRAGG R.H., WESTON A.F. (1973)

"Lead dithiolates: their use in the synthesis of cyclic disulfides."

Tetrahedron Lett. **14** (9), 655 - 6

CRECELIUS E.A. (1977)

"Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man."

Environ. Health Perspect. **19**, 147 - 50

DANIELLI J.F., DANIELLI M., FRASER J.B., MITCHELL P.D., OWEN L.N., SHAW G. (1947)

"BAL-INTRAV: a new non-toxic thiol for intravenous injection in arsenical poisoning."

Biochem. J. **41**, 325 - 33

DEKNUDT G., LEONARD A., ARANY J., JENAR-DU BOISSON G., DELAVIGNETTE E. (1986)

"In vivo studies in male mice on the mutagenic effects of inorganic arsenic."

Mutagenesis **1**, 33 - 4

DFG = DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT (1982)

"Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstoff-toleranzwerte."

Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (Hrsg.),

Verlag Chemie, Weinheim, 1982

DUGUET M. (1902)

"Sur quelques sulfamides et sulfanilides de la serie aliphatique."

Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **21**, 75 - 86

DULBECCO R., VOGT M. (1954)

"Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses."

J. Exp. Med. **99**, 167 - 82

DURLACHER S.H., BUNTING H., HARRISON H., ORDWAY N.K., ALBRINK W.S. (1946)

"The toxicological action of 2,3-dimercaptopropanol (BAL)."

J. Pharmacol. Exp. Ther. (Suppl.) **87**, 28 - 32

DUSTIN A.P., GREGOIRE C. (1933)

"Contribution à l'étude de l'action de piossons caryoclasiques sur les tumeurs animales - Premier mémoire: action du cacodylate de nu et de la trypaflavine sur le sarcome greffé, type Crocker, de la souris."

Bull. Acad. Roy. Med. Belg. **13**, 585 - 8

ELLMAN G.L. (1959)

"Tissue sulfhydryl groups."

Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 - 7

EVANS R.M., OWEN L.N. (1949a)

"Dithiols. Part II. 2,3-dimercaptopropyl ethers of glycerol and glycollic acid, with some further observations on BAL-Intrav."
J. Chem. Soc. (London), 244 - 8

EVANS R.M., FRASER J.B., OWEN L.N. (1949b)
"Dithiols. Part III. Derivatives of polyhydric alcohols."
J. Chem. Soc. (London), 248 - 55

FERGUSON J.F., GAVIS J. (1972)
"A review of the arsenic cycle in natural waters."
Water Res. 6, 1259 - 74

FERM V.H., SAKON A., SMITH B.M. (1971)
"The teratogenic profile of sodium arsenate in the golden hamster."
Arch. Environ. Health 22, 557 - 60

FEUSSNER J.R., SHELburne J.D., BREDEHOEFT S., COHEN H.J. (1979)
"Arsenic-induced bone marrow toxicity: ultrastructural and electron probe analysis."
Blood 53, 820 - 7

FIELD L., BARBEE R.B. (1969)
"Organic disulfides and related substances. XXIV. preparation and oxidation of cyclic disulfides."
J. Org. Chem. 34, 36 - 41

FIELD L. (1977)
"Disulfides and polysulfides."
in: OAE S. (ed.) "The organic chemistry of sulfur", 303 - 82
Plenum Press, New York, 1977

FIESER L.F., FIESER M. (1968)
"Organische Chemie", 2. Aufl. (deutsch), übers. v. HENSEL H.R.,
Verlag Chemie, Weinheim, 1974

FISCHER A.B., BUCHET J.P., LAUWERYS R.R. (1985)
"Arsenic uptake, cytotoxicity and detoxification in mammalian cells in culture."
Arch. Toxicol. 57, 168 - 72

FITZHUGH O.G., WOODARD G., BRAUN H.A., LUSKY L.M., CALVERY H.O. (1946)
"The toxicities of compounds related to 2,3-dimercaptopropanol (BAL) with a note on their relative therapeutic efficiency."
J. Pharmacol. Exp. Ther. (Suppl.) 87, 23 - 7

FLUHARTY A.L., SANADI D.R. (1961)

"On the mechanism of oxidative phosphorylation. II. effect of arsenite alone and in combination with 2,3-dimercaptopropanol."

J. Biol. Chem. 236, 2772 - 8

FOA V., COLUMBI A., MARONI M. (1984)

"The speciation of the forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic."

Sci. Total. Environ. 34, 241 - 59

FORSCHFVUD S., SMITH H., WASSEN A. (1964)

"Napoleon's illness 1816 - 1820 in the light of activation analyses of hairs from various dates."

Arch. Toxicol. 20, 210 - 9

FOWLER B.A. (1977)

"Toxicology of environment arsenic."

in: GOYER R.A., MEHLMAN M.A. "Advances in modern toxicology", Vol. 2, 79 - 122

Hemisphere, Washington, 1977

GABARD B., WALSER R. (1979)

"Note on the metabolism of mercury chelating agent sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate."

J. Toxicol. Environ. Health 5, 759 - 64

GAINER J.H., PRY T.W. (1972)

"Effects of arsenicals on viral infections in mice."

Amer. J. Vet. Res. 33, 2299 - 307

GILMAN A., PHILIPS F.S., ALLEN R.P., KOELLE E.S. (1946)

"The treatment of acute cadmium intoxication in rabbits with 2,3-dimercaptopropanol (BAL) and other mercaptans."

J. Pharmacol. Exp. Ther. (Suppl.) 87, 85 - 101

GINSBURG J.M., LOTSPEICH W.D. (1963)

"Interrelations of arsenate and phosphate transport in the dog kidney."

Amer. J. Physiol. 205, 707 - 14

GINSBURG J.M. (1965)

"Renal mechanism for excretion and transformation of arsenic in the dog."

Amer. J. Physiol. 208, 832 - 40

GORDON J.J., QUASTEL J.H. (1948)

"Effect of arsenicals on enzyme systems."

Biochem. J. **42**, 337 - 50

GUDER W.G., WIESNER W., STUKOWSKI B. WIELAND O.H. (1971)
"Metabolism of isolated kidney tubules. Oxygen consumption, gluconeogenesis and the effect of cyclic nucleotides in tubules from starved rats."

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 1319 - 28

GUDER W.G., WIELAND O.H., STUKOWSKI B. (1974)
"Metabolism of isolated kidney tubules. Regulation of pyruvate dehydrogenase by metabolic substrates."

Eur. J. Biochem. **42**, 529 - 38

HELLER H.J., CATSCH A. (1959)
"Einige physikalisch-chemische Überlegungen zur Dekorporation radioaktiver Metalle durch Komplexbildner."

Strahlenther. **109**, 464 - 82

HENSCHLER D. (1983)
"Wichtige Gifte und Vergiftungen. Schwermetalle."
in: FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W. (Hrsg.) "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", 4. Aufl., 652 - 69
Bibliographisches Institut, Mannheim, 1983

HERTEL C., COULTER S. J., PERKINS J.P. (1985)
"A comparison of catecholamine-induced internalization of β -adrenergic receptors and receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor in human astrocytoma cells."

J. Biol. Chem. **260**, 12547 - 53

HINE C.H., PINTO S.S., NELSON K.W. (1977)
"Medical problems associated with arsenic exposure."

J. Occup. Med. **19**, 391 - 6

HOLLAND R.H., MC CALL M.S., LANZ H.C. (1959)
"A study of inhaled arsenic-74 in man."

Cancer Res. **19**, 1154 - 6

HOLMBERG R.E., FERM V.H. (1969)
"Interrelationships of selenium, cadmium, and arsenic in mammalian teratogenesis."

Arch. Environ. Health **18**, 873 - 7

HOOD R.D. (1972a)
"Effects of sodium arsenite on fetal development."

Bull. Environ. Contam. Toxicol. **7**, 216 - 22

HOOD R.D., BISHOP S.L. (1972b)

"Teratogenic effects of sodium arsenate in mice."

Arch. Environ. Health 24, 62 - 5

HOVE E., ELVEHJEM C.A., HART E.B. (1938)

"Arsenic in the nutrition of the rat."

Amer. J. Physiol. 124, 205 - 12

HUTTON J.T., CHRISTIANS B.L., DIPPEL R.L. (1982)

"Arsenic poisoning."

New Engl. J. Med. 307, 1080

IQBAL S.M., OWEN L.N. (1960)

"Dithiols. Part XXI. Dithiols from cyclic trithiocarbonates."

J. Chem. Soc. (London), 1030 - 6

ISHINISHI N., KENZABURO T., VAHTER M., FOWLER B.A.

(1986)

"Arsenic."

in: FRIBERG L., NORDBERG G.F., VOUG V.B., KESSLER E. (eds.)

"Handbook on the toxicology of metals", 2nd ed., vol. 2, 43 - 83

Elsevier, Amsterdam, 1986

JANDER G., BLASIUS E. (1970)

"Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie",

9. Aufl., 76 - 8

S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 1970

JOCELYN P.C. (1972)

"The biochemistry of the SH group."

Academic Press, London, 1972

JOHARY N.S., OWEN L.N. (1955a)

"Dithiols. Part XV. Some polyhydroxy-derivatives of 3:4-dimercapto-
butanol."

J. Chem. Soc. (London), 1292 - 8

JOHARY N.S., OWEN L.N. (1955b)

"Dithiols. Part XVI. The O- β -D-glucoside of 1:3-dimercaptopropan-2-
ol."

J. Chem. Soc. (London), 1299 - 301

JOHARY N.S., OWEN L.N. (1955c)

"Dithiols. Part XVII. S-benzyl derivatives of 2:3-dimercaptopropanol
and 1:3-dimercaptopropan-2-ol."

J. Chem. Soc. (London), 1302 - 7

JOHARY N.S., OWEN L.N. (1955d)

"Dithiols. Part XVIII. Some water-soluble derivatives containing the sulfonic acid group."

J. Chem. Soc. (London), 1307 - 11

JOHNSTONE R.M. (1963)

"Sulphydryl agents: arsenicals."

in: HOCHSTER R.M., QUASTEL J.H. (eds.) "Metabolic inhibitors. A comprehensive treatise", vol. 2, 99 - 118

Academic Press, New York, 1963

JONES M.M., BASINGER M.A., WEAVER A.D., DAVIS C.M., VAUGHN W.K. (1980)

"Comparison of standard chelating agents for acute mercuric chloride poisoning."

Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 27, 363 - 72

JONES M.M., BASINGER M.A., WEAVER A.D. (1981)

"Chelate antidotes for acute Ni(II) intoxication."

J. Inorg. Nucl. Chem. 43, 1705 - 10

JUNG F. (1939)

"Löslichkeit und Reaktionsweise des Arsenwasserstoffs in Blut."

Biochem. Z. 302, 294 - 309

JUNG E.G., TRACHSEL B. (1970)

"Molekularbiologische Untersuchungen zur Arsen-Carcinogenese."

Arch. Klin. Exp. Dermatol. 237, 819 - 26

JUNG E.G. (1971)

"Molekularbiologische Untersuchungen zur chronischen Arsenvergiftung."

Z. Haut. Geschlechtskrankh. 46, 35 - 6

KAPLAN J., MCVEY WARD D., WILEY H.S. (1985)

"Phenylarsine oxide-induced increase in alveolar macrophage surface receptors: evidence for fusion of internal pools with the cell surface."

J. Cell Biol. 101, 121 - 9

KJELDSBERG C.R., WARD H.P. (1972)

"Leukemia in arsenic poisoning."

Ann. Int. Med. 77, 935 - 7

KLOTZ I.M., CZERLINSKI G.H., FIESS H.A. (1958)

"A mixed-valence copper complex with thiol compounds."
J. Amer. Chem. Soc. 80, 2920 - 3

KNOWLES F.C. (1982)
"The enzyme inhibitory form of inorganic arsenic."
Biochem. Int. 4, 647 - 53

KNOWLES F.C. (1985)
"Reactions of lipoamide dehydrogenase and glutathion reductase with
arsonic acids and arsonous acids."
Arch. Biochem. Biophys. 242, 1 - 10

KREBS H.A., HENSELEIT K. (1932)
"Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper."
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66

KURUVILLA A., BERGESON P.S., DONE A.K. (1975)
"Arsenic poisoning in childhood. An unsual case report with special
notes on therapy with penicillamine."
Clin. Toxicol. 8, 535 - 40

KYLE R.A., PEASE G.L. (1965)
"Hematologic aspects of arsenic intoxication."
New Engl. J. Med. 273, 18 - 23

LEE T.C., HUANG R.Y., JAN K.Y. (1985)
"Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thio-
guanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in chinese hamster
ovary cells."
Mutat. Res. 148, 83 - 9

LEONARD A., LAUWERYS R.R. (1980)
"Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic."
Mutat. Res. 75, 46 - 62

LEYH F., ROTHLAENDER J.P. (1985)
"Multiple bowenoid Arsen-Keratosen."
Dermatosen 33, 99 - 101

LIEBSCHER K., SMITH H. (1968)
"Essential and nonessential trace elements. A method of determining
whether an element is essential or nonessential in human tissue."
Arch. Environ. Health 17, 881 - 90

LINDGREN A., VAHTER M., DENCKER L. (1982)

"Autoradiographic studies on the distribution of arsenic in mice and hamsters administered ^{74}As -arsenite or -arsenate."
Acta Pharmacol. Toxicol. **51**, 253 - 65

LOCKEMAN G., PAUCKE M. (1911)
"Über die Adsorption von Arsen durch Aluminium- und Eisenhydroxyd."
Z. Chem. Ind. Koll. **8**, 273 - 88

LÜCHTRATH H. (1983)
"The consequences of chronic arsenic poisoning among Moselle wine growers."
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **105**, 173 - 82

LUGANSKII N.I., LOBODA Y.I. (1960)
["Transformation von Unithiol im Körper."]
Farmakol. Toksikol. (Moskau) **23**, 349 - 55

LUNDE G. (1973)
"The synthesis of fat and water soluble arseno organic compounds in marine and limnetic algae."
Acta Chem. Scand. **27**, 1586 - 94

LYSENKO N.M. (1974)
["Reactions of dithiols with tetramethylthiuramdisulfide and with carbon disulfide."]
Zh. Obshch. Khim. **44**, 157 - 61

MAFF = MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1982)
"The eighth report of the steering group on food surveillance. The working party on the monitoring of food stuffs for heavy metals. Survey of arsenic in food."
Food Surveillance Paper No. 8, HMSO, London

MAHAFFEY K.R., FOWLER B.A. (1977)
"Effects of concurrent administration of lead, cadmium, and arsenic in the rat."
Environ. Health Perspect. **19**, 165 - 71

MAHIEU P., BUCHET J.P., ROELS H.A., LAUWERYS R. (1981)
"The metabolism of arsenic in humans acutely intoxicated by As_2O_3 . Its significance for the duration of BAL therapy."
Clin. Toxicol. **18**, 1067 - 75

MAPPES R. (1977)
"Versuche zur Ausscheidung von Arsen im Urin."

Int. Arch. Occup. Environ. Health **40**, 267 - 72

MARCH J. (1977)

"Advanced organic chemistry", 2nd ed.,
McGraw-Hill, Auckland, 1977

MCBRIDE B.C., MERILEES H., CULLEN W.R., PICKETT W. (1978)

"Anaerobic and aerobic alkylation of arsenic."

in: BRINCKMAN F.E., BELLAMA J.M. (eds.), "Organometals and organometalloids", (ACS Symposium Ser. 82), 94 - 115,
American Chemical Society, Washington, DC, 1978

MEALEY J., BROWNELL G.L., SWEET W.H. (1959)

"Radioarsenic in plasma, urine, normal tissues, and intracranial neoplasms."

Arch. Neurol. Psychiatr. **81**, 310 - 20

MEYERS F.H., JAWETZ E., GOLDFIEN A. (1980)

"Review of medical pharmacology.", 7th ed., 10 -2
Lange, Los Altos, CA, 1980

MITCHELL R.A., CHANG B.F., HUANG C.H., DEMASTER E.G. (1971)

"Inhibition of mitochondrial energy-linked functions by arsenate. Evidence for a nonhydrolytic mode of inhibitor action."

Biochemistry **10**, 2049 - 54

MODELL W., CHENOWETH M.B., KROP S. (1946)

"Toxicity of 2,3-dimercaptopropanol (BAL) in cats."

J. Pharmacol. Exp. Ther. (Suppl.) **87**, 33 - 40

MOESCHLIN S. (1980)

"Klinik und Therapie der Vergiftungen", 6. Aufl.,
Thieme Verlag, Stuttgart, 1980

MOUREU M.C. (1894)

"Contribution a l'étude de l'acide acrylique et des ses dérivés."

Ann. Chim. Phys. (Paris), Serie **7**(2), 145 - 212

MÜLLER W.U., STREFFER C., FISCHER-LAHDO C. (1986)

"Toxicity of sodium arsenite in mouse embryos in vitro and its influence on radiation risk."

Arch. Toxicol. **59**, 172 - 5

NAGASAWA H.T., GOON D.J.W., ZERA R.T., YUZON D.L. (1982)

"Prodrugs of L-Cysteine as liver-protective agents. 2(RS)-methyl-thiazolidine-4(R)-carboxylic acid, a latent cysteine."

J. Med. Chem. **25**, 489 - 91

NIGROVIC V. (1963)

"Der Einfluß von Chelatbildnern auf das Verhalten von Quecksilber im Organismus."

Arzneim. Forsch. **13**, 787 - 92

NORDENSON I., BECKMAN L. (1982)

"Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Reanalysis and follow up of chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic."

Hereditas **96**, 175 - 81

NRC = THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1977)

"Medical and biologic effects of environmental pollutants. Arsenic."

COMMITTEE ON MEDICAL AND BIOLOGIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS (ed.),

Nat. Acad. of Sciences, Washington, D.C., 1977

OKUI T., FUJIWARA Y. (1986)

"Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells."

Mutat. Res. **172**, 69 - 76

ORMSTAD K., ORRENIUS S., LÅSTBOM T., UEHARA N., POHL J., BROCK N. (1983)

"Pharmacokinetics and metabolism of sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) in the rat."

Cancer Res. **43**, 333 - 8

OWEN L.N. (1961)

"Dithiols."

in: KHARASCH N. (ed.), "Organic sulfur compounds", Vol. 1, 199 - 209, Pergamon Press, New York, 1961

PATAI S. (ed.) (1974)

"The chemistry of the thiol group", Part 1 & 2, J. Wiley, London, 1974

PAVLIC A.A. (1946)

"Introduction of mercapto groups into organic compounds." (USP 2.408.094)

zitirt nach: Chem. Abstr. **41**, 775g (1947)

PAVLIC A.A., LAZIER W.A., SIGNAIGO F.K. (1949)

"Synthesis of some vicinal dithiols and their derivatives."

J. Org. Chem. **14**, 59 - 64

PEARSON R.G. (1972)

"Hard and soft acids and bases."

in: CHAPMAN N.B., SHORTER J. (eds.), "Advances in linear free-energy relationships", 281 - 319

Plenum Press, New York, 1972

PETERS R.A., STOCKEN L.A., THOMPSON R.H.S. (1945)

"British Anti-Lewisite (BAL)."

Nature **156**, 616 - 9

PETERS R.A. (1955)

"Biochemistry of some toxic agents. I. Present state of knowledge of biochemical lesions induced by trivalent arsenical poisoning."

Bull. Johns Hopkins Hosp. **97**, 1 - 20

PETRES J., BERGER A. (1972)

"Zum Einfluß anorganischen Arsens auf die DNS-Synthese menschlicher Lymphocyten in vitro."

Arch. Dermatol. Forsch. **242**, 343 - 52

PETRES J., BARON D., KUNICK I. (1974)

"Untersuchungen über arsenbedingte Veränderungen der Nucleinsäuresynthese in vitro."

Dermatol. Mschr. **160**, 724 - 9

PETRUNKIN V.E. (1959)

["Ergebnisse der Darstellung von Thiolverbindungen als Antidote von Arsen und Schwermetallen."]

in: Ukrain. Nauch.-Issledovat. Sanit.-Khim. Inst. (Hrg.),

["Schwefelverbindungen in der Medizin"], 7 - 18, (Kongreßbericht) Kiev, 1959

auch zitiert in: Chem. Abstr. **54**, 24378 - 80 (1960)

REAY P.F., ASHER C.J. (1977)

"Preparation and purification of ^{74}As -labeled arsenate and arsenite for use in biological experiments."

Anal. Biochem. **78**, 557 - 60

SCHÖBERL A., WAGNER A. (1955)

"Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Mercaptanen und Thiophenolen."

in: MÜLLER E. (HRG.), HOUBEN-WEYL "Methoden der organischen Chemie", Bd.IX, 7 - 48

Thieme Verlag, Stuttgart, 1955

SCHROEDER H.A., BALASSA J.J. (1966)
 "Abnormal trace elements in man: arsenic."
 J. Chron. Dis. 19, 85 - 106

SEEL F. (1963)
 "Grundlagen der analytischen Chemie"
 Verlag Chemie, Weinheim, 1963

SIEGAL G.J., ALBERS R.W. (1967)
 "Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of Electrophorus electric organ. IV. Modification of responses to sodium and potassium by arsenite plus 2,3-dimercaptopropanol."
 J. Biol. Chem. 242, 4972 - 9

SMITH J.D. (1973)
 "Arsenic, antimony and bismuth."
 in: BAILAR J.C., EMELEUS H.J., NYHOLM R., TROTMAN-DICKENSON A.F. (eds.), "Comprehensive inorganic chemistry", Vol. 2, 547 - 683
 Pergamon Press, Oxford, 1973

SOLLMANN T. (1957)
 "A manual of pharmacology", 8th ed.,
 Saunders, Philadelphia, 1957

SPECTOR W.S. (ed.) (1956)
 "Handbook of toxicology", Vol. 1,
 Saunders, Philadelphia, 1956

STOCKEN L.A., THOMPSON R.H.S. (1946)
 "British Anti-Lewisite. 2. Dithiol compounds as antidotes for arsenic."
 Biochem. J. 40, 535 - 48

SZINICZ L., WEGER N., SCHNEIDERHAN W., KIESE M. (1979)
 "Nephrotoxicity of aminophenols: effects of 4-dimethylaminophenol on isolated rat kidney tubules."
 Arch. Toxicol. 42, 63 - 73

TAM G.K.H., CHARBONNEAU S.M., BRYCE F., POMROY F., SANDI F. (1979)
 "Metabolism of inorganic arsenic (^{74}As) in humans following oral ingestion."
 Toxicol. Appl. Pharmacol. 50, 319 - 22

TERADA H., KATSUTA K., SASAGAWA T., SAITO H., SHIRATA H.,
FUKUCHI K., SEKIYA T., YOKOYAMA Y., HIIROKAWA S., WATANABE
Y., HASEGAWA K., OSHINA T., SEKIGUCHI T. (1960)
"Clinical observations of chronic toxicosis by arsenic."
Nihon Rinsho **118**, 2394 - 403 (EPA-Übersetzung Nr. TR 106-74)

THOMSON J.F., SAVIT J., GOLDWASSER E. (1947)
"Tests of 2,3-dimercaptopropanol and related dithiols for decontamina-
tion of Lewisite on human skin."
J. Pharmacol. Exp. Ther. **82**, 1 - 13

TÜV = TECHNISCHER ÜBERWACHUNGSVEREIN RHEINLAND e.V.
(1979)
"Luftverunreinigungen durch Schwermetallverbindungen aus Einsatz-
stoffen und Erzeugnissen.", Bericht für das Umweltbundesamt
Köln, 1979

TÜV = TECHNISCHER ÜBERWACHUNGSVEREIN RHEINLAND e.V.
(1981)
"Luftverunreinigungen durch Schwermetallverbindungen aus Einsatz-
stoffen und Erzeugnissen.", Bericht für das Umweltbundesamt
Köln, 1981

UBA = Umweltbundesamt (1983)
"Umwelt- und Gesundheitskriterien für Arsen. Teil II. Umweltbelastung
durch Arsen in der Bundesrepublik Deutschland.", Bericht 4/83
E. Schmidt Verlag, Berlin, 1983

VAHTER M., ENVALL J. (1983)
"In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits."
Environ. Res. **32**, 14 - 24

VAHTER M. (1986)
"Environmental and occupational exposure to inorganic arsenic."
Acta Pharmacol. Toxicol. **59** (Suppl. VII), 31 - 4

VALLEE B.L., ULMER D.D., WACKER W.E.C. (1960)
"Arsenic toxicology and biochemistry."
Arch. Ind. Health **21**, 132 - 51

VASILEVA E.V., NEDOPEKIN T.K. (1959)
["Untersuchung zur Stabilität einiger Mercaptoverbindungen mit
Metallen."]

in: Ukrain. Nauch.-Issledovat. Sanit.-Khim. Inst. (Hrg.),
["Schwefelverbindungen in der Medizin"], 36 - 9, (Kongreßbericht)
Kiev, 1959

VASILEVA T.P., LINKOVA M.G., KILDISCHEVA O.V. (1976)
"Four- and five-membered cyclic disulfides."
Russ. Chem. Rev. **45**, 639 - 59

WEBB J.L. (1966)
"Enzymes and metabolic inhibitors", Vol. III, 795 - 819
Academic Press, London, 1966

WELCH A.D., LANDAU R.L. (1942)
"The arsenic analogue of choline as a component of lecithin in rats fed
arseno-choline chloride."
J. Biol. Chem. **144**, 581 - 8

WESTERNHAGEN B.V. (1970)
"Histochemical demonstrable metabolic changes in the inner ear of the
guinea pig after chronic arsenic poisoning."
Arch. Klin. Exp. Ohren-Nasen-Kehlkopfheilk. **197**, 7 - 13

WESTHOFF D.D., SAMAHA R.J., BARNES A. (1975)
"Arsenic intoxication as a cause of megaloblastic anemia."
Blood **45**, 241 - 6

WHITTAKER V.P. (1947)
"An experimental investigation on the 'ring hypothesis' of arsenical
toxicity."
Biochem. J. **41**, 56 - 62

WHO = WORLD HEALTH ORGANIZATION (1973)
"Trace elements in human nutrition. Report of a WHO expert
committee."
WHO Technical Report Series No. 532, Genf, 1973

WHO = WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981)
"Environmental health criteria 18: arsenic."
WHO, Genf, 1981

WHO = WORLD HEALTH ORGANIZATION (1983)
"27th report of the joint FAO/WHO expert committee on food
additives."
WHO Technical Report Series No. 696, Genf, 1983

WIBERG N. (1985)

in: HOLLEMAN A.F., WIBERG E. "Lehrbuch der anorganischen Chemie", 91.-100. Aufl., 212 - 4
de Gruyter, Berlin, 1985

WIEDEMANN P., FICHTL B., SZINICZ L. (1982)

"Pharmacokinetics of ^{14}C -DMPS (sodium 1,3- ^{14}C -2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate) in beagle dogs."
Biopharmaceut. Drug Disp. **3**, 267 - 74

WINSHIP K.A. (1984)

"Toxicity of inorganic arsenic salts."
Adv. Drug Res. Ac. Pois. Rev. **3**, 129 - 60

WOIDICH H., PFANNHAUSER W. (1979)

"Schwermetallbelastung der Nahrung in Österreich: Arsen-Gehalte in Lebensmitteln und monatliche Aufnahme."
Dtsch. Lebensm. Rundschau **75**, 190 - 5

WOODWARD G.E., FRY E.G. (1932)

"The determination of blood glutathione."
J. Biol. Chem. **97**, 465 - 82

WULLSTEIN L.H., SNYDER K. (1971)

"Arsenic pollutants in the ecosystem."
in: NATIONAL SOCIETY FOR CLEAN AIR (ed.), Proceedings of the second international clean air congress, 295 - 301,
Washington, D.C., 1971

WU C. (1965)

"Glutamine synthetase. VI. Mechanism of the dithiol-dependent inhibition by arsenite."
Biochim. Biophys. Acta **96**, 134 - 47

Lebenslauf

Harald M ü c k t e r, geboren am 27. Juli 1952 in Stolberg/Rhld. als erstes Kind der Eheleute Dr. Heinrich Mückter und Frau Hedi, geb. Klinkenberg,

- | | |
|-------------|---|
| 1959 | Einschulung in die kath. Volksschule Höfchensweg, Aachen |
| 1963 | Wechsel zum städt. Kaiser-Karls-Gymnasiums in Aachen |
| 1971 | Reifeprüfung am Kaiser-Karls-Gymnasium |
| 1971 | Beginn des Doppelstudiums Medizin / Chemie an der
RWTH Aachen |
| 1972 | Naturwiss. Vorprüfung |
| 1974 | Chemie-Vordiplom |
| 1975 | Ärztliche Vorprüfung |
| 1976 | Fortsetzung des Doppelstudiums an der TU München |
| 1978 | Ärztliche Prüfung (I. Abschnitt) |
| 1980 | Chemie-Diplom |
| 1981 | Ärztliche Prüfung (II. Abschnitt) |
| 1982 | Ärztliche Prüfung (III. Abschnitt) u. Approbation |
| 1982 - 1983 | Wehrdienst |
| 1984 - 1987 | wiss. Hilfskraft am Institut f. Organische Chemie und Bio-
chemie der TU München |
| seit 1988 | wiss. Mitarbeiter am Walther Straub-Institut für Pharma-
kologie und Toxikologie der Universität München |

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606